

## ESTROGEN RECEPTOR GENE AND ITS USE

**Publication number:** JP2001352992

**Publication date:** 2001-12-25

**Inventor:** SAITO KOICHI

**Applicant:** SUMITOMO CHEMICAL CO

**Classification:**

**- international:** *G01N33/50; C07K14/72; C12N1/19; C12N5/10; C12N7/00; C12N15/09; C12P21/02; C12Q1/02; C12Q1/68; G01N33/15; G01N33/566; G01N33/68; C12P21/02; G01N33/50; C07K14/435; C12N1/19; C12N5/10; C12N7/00; C12N15/09; C12P21/02; C12Q1/02; C12Q1/68; G01N33/15; G01N33/566; G01N33/68; C12P21/02; (IPC1-7): C12N15/09; C07K14/72; C12N1/19; C12N5/10; C12N7/00; C12P21/02; C12Q1/02; C12Q1/68; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/566; G01N33/68*

**- European:**

**Application number:** JP20010106905 20010405

**Priority number(s):** JP20010106905 20010405; JP20000106253 20000407

**Report a data error here**

### Abstract of **JP2001352992**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a new estrogen receptor gene and the like available or a test system used for evaluating modulation ability for estrogen receptor activity of a chemical substance.

**SOLUTION:** The invention provides a gene encoding an estrogen receptor represented by either (a), (b) or (c), and the like. (a) an estrogen receptor having an amino acid sequence represented by amino acid number 153 to 602 in an amino acid sequence represented by sequence number 1 (referring to the specification) (b) an estrogen receptor having the amino acid sequence represented by the sequence number 1. (c) an estrogen receptor having an amino acid sequence showing 95% or more amino acid identity to the amino acid sequence represented by the amino acid number 153 to 602 in the amino acid sequence represented by the sequence number 1.

---

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-352992

(P2001-352992A)

(43) 公開日 平成13年12月25日 (2001. 12. 25)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 K 14/72	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/72		C 1 2 N 1/19	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/19		7/00	4 B 0 6 3
5/10		C 1 2 P 21/02	C 4 B 0 6 4
7/00		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 請求項の数22 O L (全 26 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-106905 (P2001-106905)

(22) 出願日 平成13年4月5日 (2001. 4. 5)

(31) 優先権主張番号 特願2000-106253 (P2000-106253)

(32) 優先日 平成12年4月7日 (2000. 4. 7)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002093

住友化学工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72) 発明者 斎藤 幸一

大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住

友化学工業株式会社内

(74) 代理人 100093285

弁理士 久保山 隆 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エストロゲンレセプター遺伝子およびその利用

(57) 【要約】

【課題】 化学物質のエストロゲンレセプター活性調節能を評価するための試験系に利用することのできる新たなエストロゲンレセプター遺伝子等を提供可能とする。

【解決手段】 下記の (a) ~ (c) のいずれかのエストロゲンレセプターをコードする遺伝子、等。

(a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号153~602で表されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(c) 配列番号1で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号153~602で表されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の(a)～(c)のいずれかのエストロゲンレセプターをコードする遺伝子。

(a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号153～602で表されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(c) 配列番号1で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号153～602で表されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

【請求項2】以下の(d)または(e)の塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子。

(d) 配列番号2で示される塩基配列のうちの塩基番号460～1809で表される塩基配列。

(e) 配列番号2で示される塩基配列のうちの塩基番号4～1809で表される塩基配列。

【請求項3】請求項1または2に記載のエストロゲンレセプター遺伝子を含有するベクター。

【請求項4】エストロゲンレセプター遺伝子に、プロモーターが機能可能な形で結合されてなる請求項3記載のベクター。

【請求項5】ベクターがウイルスである請求項3または4に記載のベクター。

【請求項6】請求項1または2に記載のエストロゲンレセプター遺伝子を含有するウイルス粒子。

【請求項7】宿主細胞内で複製可能なベクターに、請求項1または2に記載のエストロゲンレセプター遺伝子を組込むことを特徴とするベクターの製造方法。

【請求項8】請求項1もしくは2に記載の遺伝子または請求項3～5のいずれかに記載のベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項9】エストロゲンレセプター遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる請求項8に記載の形質転換体。

【請求項10】宿主細胞が動物細胞である請求項8または9に記載の形質転換体。

【請求項11】宿主細胞が哺乳類動物細胞である請求項8～10のいずれかに記載の形質転換体。

【請求項12】宿主細胞が昆虫類動物細胞である請求項8～10のいずれかに記載の形質転換体。

【請求項13】宿主細胞が酵母細胞である請求項8または9に記載の形質転換体。

【請求項14】請求項1もしくは2に記載の遺伝子または請求項3～5のいずれかに記載のベクターを宿主細胞に導入することを特徴とする形質転換体の製造方法。

【請求項15】請求項8～13のいずれかに記載の形質転換体を培養してエストロゲンレセプターを産生させることを特徴とするエストロゲンレセプターの製造方法。

【請求項16】請求項1または2に記載のエストロゲンレセプター遺伝子の300以上の塩基からなる部分塩基配列を有するDNA。

【請求項17】部分塩基配列が、エストロゲンレセプターのリガンド結合領域をコードする塩基配列である請求項16記載のDNA。

【請求項18】以下の(f)～(h)のいずれかのアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(f) 配列番号1で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号153～602で表されるアミノ酸配列。

(g) 配列番号1で示されるアミノ酸配列。

(h) 配列番号1で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号153～602で表されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列。

【請求項19】エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子と請求項1または2に記載のエストロゲンレセプター遺伝子とが宿主細胞に導入されてなる形質転換体と、被験物とを接触させ、該形質転換体における前記レポーター遺伝子の発現量を測定する工程を含む被験物のエストロゲンレセプター活性調節能の評価方法。

【請求項20】リガンド依存的にエストロゲンレセプターに結合可能な転写共役因子もしくは該転写共役因子のレセプター結合領域と、エストロゲンレセプターとが、リガンド依存的に複合体を形成することによりレポーター遺伝子の転写が活性化されるツーマイブリッドシステムにおいて、被験物のエストロゲンレセプター活性調節能を測定するための請求項1または2に記載のエストロゲンレセプター遺伝子の使用。

【請求項21】リガンド依存的にエストロゲンレセプターに結合可能な転写共役因子もしくは該転写共役因子のレセプター結合領域と、エストロゲンレセプターのリガンド結合領域とが、リガンド依存的に複合体を形成することによりレポーター遺伝子の転写が活性化されるツーマイブリッドシステムにおいて、被験物のエストロゲンレセプター活性調節能を測定するための請求項16または17に記載のDNAの使用。

【請求項22】請求項18記載のエストロゲンレセプターと被験物とを接触させ保温する工程を含むレセプターバインディングアッセイ。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エストロゲンレセプター遺伝子およびその利用に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】近年、環境中の幾つかの化学物質がエストロゲン様活性を示すことが報告され、例えばある種の化学物質による野生の魚類等の雌性化の報告がなされている(T.Colborn, D.Dumanoski and J.P.Myers著: Our Stolen Future, 199

6, Dutton, New York 発行)。かかる化学物質の活性はヒトを含めた各種生物のホルモンバランスを崩し、異常や疾患の原因となることが危惧されることから、化学物質の安全性評価の一環として化学物質のエストロゲン様活性を測定する試みがなされている。エストロゲンの標的細胞に存在するエストロゲンレセプターにエストロゲンが結合すると、該レセプターは活性化されて染色体上のエストロゲン応答配列に結合し、そこへさらに、エストロゲンとエストロゲンレセプターとの複合体を認識する転写共役因子群が結合して、該応答配列の下流に在する遺伝子の発現を促進する。そこで、化学物質のエストロゲン様活性を測定するための方法として、化学物質のエストロゲンレセプター活性調節能を評価するための試験系の開発が求められており、該試験系に利用することのできるエストロゲンレセプター遺伝子の取得が切望されている。

#### 【0003】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる状況の下、鋭意検討した結果、水生動物のモデル動物であるファットヘッドミノーからエストロゲンレセプター遺伝子を単離することに成功し、本発明に至った。すなわち、本発明は、

1) 以下の (a) ~ (c) のいずれかのエストロゲンレセプターをコードする遺伝子 (以下、本発明遺伝子と記す。)、

(a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号 153 ~ 602 で表されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(b) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(c) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号 153 ~ 602 で表されるアミノ酸配列に対して 95 % 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

2) 以下の (d) または (e) の塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子、

(d) 配列番号 2 で示される塩基配列のうちの塩基番号 460 ~ 1809 で表される塩基配列。

(e) 配列番号 2 で示される塩基配列のうちの塩基番号 4 ~ 1809 で表される塩基配列。

3) 本発明遺伝子を含有するベクター (以下、本発明ベクターと記す。)

4) 宿主細胞内で複製可能なベクターに本発明遺伝子を組込むことを特徴とするベクターの製造方法、

5) 本発明遺伝子または本発明ベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体 (以下、本発明形質転換体と記す。)、

6) 本発明遺伝子または本発明ベクターを宿主細胞に導入することを特徴とする形質転換体の製造方法、

7) 本発明形質転換体を培養してエストロゲンレセプタ

ーを産生させることを特徴とするエストロゲンレセプターの製造方法、

8) 本発明遺伝子の 300 以上の塩基からなる部分塩基配列を有する DNA、

9) 部分塩基配列が、エストロゲンレセプターのリガンド結合領域をコードする塩基配列である前項 8) 記載の DNA、

10) 以下の (f) ~ (h) のいずれかのアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター (以下、本発明レセプターと記す。)、

(f) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号 153 ~ 602 で表されるアミノ酸配列。

(g) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列。

(h) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号 153 ~ 602 で表されるアミノ酸配列に対して 95 % 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列。

11) エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子と本発明遺伝子とが宿主細胞に導入されてなる形質転換体と、被験物とを接触させ、該形質転換体における前記レポーター遺伝子の発現量を測定する工程を含む被験物のエストロゲンレセプター活性調節能の評価方法、

12) リガンド依存的にエストロゲンレセプターに結合可能な転写共役因子もしくは該転写共役因子のレセプター結合領域と、エストロゲンレセプターとが、リガンド依存的に複合体を形成することによりレポーター遺伝子の転写が活性化されるツウハイブリッドシステムにおいて、被験物のエストロゲンレセプター活性調節能を測定するための本発明遺伝子の使用、

30 13) リガンド依存的にエストロゲンレセプターに結合可能な転写共役因子もしくは該転写共役因子のレセプター結合領域と、エストロゲンレセプターのリガンド結合領域とが、リガンド依存的に複合体を形成することによりレポーター遺伝子の転写が活性化されるツウハイブリッドシステムにおいて、被験物のエストロゲンレセプター活性調節能を測定するための前項 8) 記載の DNA の使用、

40 14) 本発明レセプターと被験物とを接触させ保温する工程を含むレセプターバインディングアッセイを提供するものである。

#### 【0004】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。本発明遺伝子には、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号 153 ~ 602 で表されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターをコードする遺伝子、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターをコードする遺伝子、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号 153 ~ 602 で表されるアミノ酸配列に対して 95 % 以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロ

ゲンレセプターをコードする遺伝子が含まれ、より具体的には、配列番号2で示される塩基配列の塩基番号460～1809で表される塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子、配列番号2で示される塩基配列のうちの塩基番号4～1809で表される塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子等が含まれる。本発明レセプターには、配列番号1で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号153～602で表されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター、配列番号1で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号153～602で表されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターが含まれる。本発明において、「配列番号1で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号153～602で表されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター」としては、例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号153～602で表されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有し、かつ、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターと実質的に同等の特性のレセプター機能を有する蛋白質をあげることができる。レセプター機能は、例えば、後述のレポーターアッセイ、ツーハイブリッドシステム、レセプターバインディングアッセイ等に基づき評価することができる。また、かかるエストロゲンレセプターのアミノ酸配列において認められる、配列番号1で示されるアミノ酸配列のうちのアミノ酸番号153～602で表されるアミノ酸配列との相違としては、アミノ酸の欠失、置換、修飾、付加等の変異をあげることができる。これらには、遺伝子への部位特異的変異導入法や突然変異処理等によって人為的に導入され得る変異に加えて、動物の系統、個体、器官、組織等の違いに基づくアミノ酸配列の違いなどの天然に生ずる多型変異も含まれる。

【0005】本発明遺伝子は、例えば、ファットヘッドミノー（学名：*Pimephales promelas*）などの魚類等の動物の組織から、J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis 著；モレキュラー クローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリング ハーバー ラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory 発行、1989年）等に記載の遺伝子工学的的方法に準じて取得することができる。具体的には、まず、ファットヘッドミノーなどの魚類等の動物の組織由来の全RNAを調製する。例えば、ファットヘッドミノーの肝臓等の組織を塩酸グアニジンやグアニジンチオシアネート等の蛋白質変性剤を含む溶液中で粉砕し、さらに該粉砕物にフェノール、クロロホルム等を加えることにより蛋白質を変性させる。変性蛋白質を遠心分離等により除去した後、回収された上

清画分から塩酸グアニジン/フェノール法、SDS-フェノール法、グアニジンチオシアネート/CsCl法等の方法により全RNAを抽出する。なお、これらの方法に基づいた市販のキットとしては、例えばISOGEN（ニッポンジーン製）がある。得られた全RNAを鋳型としてオリゴdTプライマーをRNAのポリA配列にアニールさせ、逆転写酵素により一本鎖cDNAを合成する。次いで、該一本鎖cDNAを鋳型とし、かつ大腸菌RNaseHを用いてRNA鎖にニックとギャップを入れることにより得られるRNAをプライマーとして大腸菌のDNAポリメラーゼIを用いて二本鎖のcDNAを合成する。更に、該二本鎖cDNAの両末端をT4 DNAポリメラーゼにより平滑化する。得られた二本鎖cDNAは、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿等の通常の方法により精製、回収する。なお、これらの方法に基づいた市販のキットとしては、例えばcDNA合成システムプラス（アマシャムファルマシアバイオテック社製）やTimeSaver cDNA合成キット（アマシャムファルマシアバイオテック社製）等があげられる。次に、得られた二本鎖cDNAを例えば、プラスミドpUC118やファージλgt10などのベクターとリガーゼを用いて連結することによりcDNAライブラリーを作製する。このようなcDNAライブラリーから、例えば、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有するDNAをプローブとして用いるハイブリダイゼーション法や、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるポリメラーゼチェーン反応（以下、PCRと記す。）により、本発明遺伝子を取得することができる。ハイブリダイゼーション法に用いられるプローブとしては、例えば、配列番号2で示される塩基配列の塩基番号4～129、474～574、697～1053または1726～1782のいずれかで表される塩基配列を有するDNA等があげられる。また、ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、6×SSC（0.9M NaCl、0.09Mクエン酸ナトリウム）、5×デンハルト溶液（0.1%（w/v）フィコール400、0.1%（w/v）ポリビニルピロリドン、0.1%（w/v）BSA）、0.5%（w/v）SDSおよび100μg/ml変性サケ精子DNA存在下、または100μg/ml変性サケ精子DNAを含むDIG EASY Hyb溶液（ベアリンガーマンハイム社）中で、65℃で保温し、次いで1×SSC（0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム）および0.5%（w/v）SDS存在下に、室温で15分間の保温を2回行い、さらに0.1×SSC（0.015M NaCl、0.0015Mクエン酸ナトリウム）および0.5%（w/v）SDS存在下に、68℃で30分間保温する条件等をあげることができる。PCRに用いられるプライマーとしては、例えば、約20bpから約40bp程度の長さのオリゴヌクレオチドであって、配列番号2で示される塩基配列の5'末端領域から選択した塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、および配列番号2で示される塩基配列の3'非翻訳領域から選択した塩基配列に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをあげることができる。具体的には、例えばフォワードプライマーとして

は、配列番号2で示される塩基配列の塩基番号4~27で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをあげることができ、より具体的には配列番号4で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドや配列番号8で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをあげることができる。また、リバースプライマーとしては、配列番号2で示される塩基配列の塩基番号1945~1965で表される塩基配列に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、より具体的には配列番号9で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをあげることができ、配列番号5で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをあげることができる。PCRの条件としては、例えば、反応液50 $\mu$ l中に、10 x Ex Taq緩衝液（宝酒造社製）5 $\mu$ l、2.5mM dNTP混合液（各2.5mMのdATP, dGTP, dCTPおよびdTTPを含む。）4 $\mu$ l（dATP, dGTP, dCTPおよびdTTP各々の終濃度が0.2mM）、20 $\mu$ Mプライマー 各0.25~1.25 $\mu$ l（終濃度が0.1~0.5 $\mu$ M）、鋳型cDNA 0.1~0.5 $\mu$ g、Ex Taq polymerase（宝酒造社製）1.25ユニットを含む組成の反応液にて、94℃で1分間次いで55℃で2分間更に72℃で2.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル行う等の条件が挙げられる。このようにして得られた本発明遺伝子は、例えば、J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis 著；モレキュラー クローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリング ハーバーラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）発行、1989年等に記載の遺伝子工学的方法に準じてベクターにクローニングすることができる。具体的には例えば、TAクローニングキット（Invitrogen社）やpBluescriptII（Stratagene社）などの市販のプラスミドベクターを用いてクローニングすることができる。尚、本発明遺伝子は、例えば配列番号2で示される塩基配列に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法（Hunkapiller, M. et al., Nature, 310, 105, 1984）等の通常の方法に準じて、核酸の化学合成を行うことにより調製することもできる。得られた本発明遺伝子の塩基配列は、Maxam Gilbert法（例えば、Maxam, A. M. & W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 560, 1977等に記載される）やSanger法（例えばSanger, F. & A. R. Coulson, J. Mol. Biol., 94, 441, 1975、Sanger, F. & Nicklen and A. R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463, 1977等に記載される）等により確認することができる。

【0006】本発明遺伝子を、該遺伝子が導入される宿主細胞において利用可能なベクター（以下、基本ベクターと記す。）、例えば、宿主細胞中で複製可能な遺伝情報を含み、自立的に増殖でき、宿主細胞からの単離、精製が可能であり、検出可能なマーカーをもつベクターに、通常の遺伝子工学的手法に準じて組み込むことにより本発明ベクターを構築することができる。本発明ベクターの構築に用いることができる基本ベクターとしては、具体的には大腸菌を宿主細胞とする場合、例えばブ

ラスミドpUC119（宝酒造社製）や、ファージミドpBluescriptII（Stratagene社製）等を上げることができる。出芽酵母を宿主細胞とする場合は、プラスミドpGBT9、pGAD24、pACT2（Clontech社製）などをあげることができる。また、哺乳類動物細胞を宿主細胞とする場合はpRc/RSV、pRc/CMV（Invitrogen社製）等のプラスミド、ウシバピローマウイルスプラスミドpBPV（アマシャムファルマシアバイオテック社製）もしくはEBウイルスプラスミドpCEP4（Invitrogen社製）等のウイルス由来の自律複製起点を含むベクター、ワクシニアウイルス等のウイルスなどをあげることができ、昆虫類動物細胞を宿主細胞とする場合には、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスをあげることができる。自律複製起点を含むベクター、例えば、上記の酵母用プラスミドpACT2や、ウシバピローマウイルスプラスミドpBPV、EBウイルスプラスミドpCEP4などを用いて本発明ベクターを構築すると、該ベクターは宿主細胞に導入された際にエピソームとして細胞内に保持される。バキュロウイルスやワクシニアウイルス等のウイルスに本発明遺伝子を組み込むには、使用しようとするウイルスのゲノムと相同な塩基配列を含有するトランスファーベクターを用いることができる。このようなトランスファーベクターの具体的例としては、Pharmingen社から市販されているpVL1392, pVL1393（Smith, G. E., Summers M. D. et al.: Mol. Cell. Biol., 3, 2156-2165 (1983)）、pSF B5（Funahashi, S. et al.: J. Virol., 65, 5584-5588 (1991)）などのプラスミドをあげることができる。本発明遺伝子を前記のようなトランスファーベクターに挿入し、該トランスファーベクターとウイルスのゲノムとを同時に宿主細胞に導入すると、トランスファーベクターとウイルスのゲノムとの間で相同組換えが起こり、本発明遺伝子がゲノム上にくみこまれたウイルスを得ることができる。ウイルスのゲノムとしては、Baculovirus, Adenovirus, Vacciniavirusなどのゲノムを用いることができる。より具体的には、例えばバキュロウイルスに本発明遺伝子を組み込む場合、トランスファーベクターpVL1393, pVL1392等のマルチクローニング部位に本発明遺伝子を挿入した後、該トランスファーベクターのDNAとBaculovirus genome DNA（Baculogold; Pharmingen社製）とを昆虫細胞Sf21株（ATCCから入手可能）にリン酸カルシウム法等により導入し、得られた細胞を培養する。培養液から遠心分離等により、本発明遺伝子が挿入されたウイルスのゲノムを含有するウイルス粒子を回収し、これをフェノール等で除蛋白処理することにより、本発明遺伝子を含有するウイルスのゲノムを得ることができる。さらに、該ウイルスのゲノムを、昆虫細胞Sf21株などのウイルス粒子形成能を有する宿主細胞にリン酸カルシウム法等により導入し、得られる細胞を培養することにより、本発明遺伝子を含有するウイルス粒子を増やすことができる。一方、マウス白血病レトロウイルスなどの比較的小さなゲノムへは、トランスファーベクターを利用せず

に、本発明遺伝子を直接組み込むこともできる。例えばウイルスベクター-DC(X) (Eli Gilboa et al., BioTechniques, 4, 504-512(1986)) などは、該ベクター上のクロニング部位に本発明遺伝子を組み込む。得られた本発明遺伝子の組込まれたウイルスベクターを、例えばAmpligPE (J. Virol., 66, 3755(1992)) などのパッケージング細胞に導入することにより、本発明遺伝子の挿入されたウイルスのゲノムを含有するウイルス粒子を得ることができる。

【0007】本発明遺伝子上流に、宿主細胞で機能可能なプロモーターを機能可能な形で結合させ、これを上述のような基本ベクターに組み込むことにより、本発明遺伝子を宿主細胞で発現させることの可能な本発明ベクターを構築することができる。ここで、「機能可能な形で結合させる」とは、本発明遺伝子が導入される宿主細胞において、プロモーターの制御下に本発明遺伝子が発現されるように、該プロモーターと本発明遺伝子とを結合させることを意味する。宿主細胞で機能可能なプロモーターとしては、導入される宿主細胞内でプロモーター活性を示すDNAをあげることができる。例えば、宿主細胞が大腸菌である場合には、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター (lacP)、トリプトファンオペロンのプロモーター (trpP)、アルギニンオペロンのプロモーター (argP)、ガラクトースオペロンのプロモーター (galP)、tacプロモーター、T7プロモーター、T3プロモーター、λファージのプロモーター (λ-pl, λ-pR) 等をあげることができ、宿主細胞が動物細胞や分裂酵母である場合には、例えば、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、シミアンウイルス (SV40) の初期または後期プロモーター、マウス乳頭腫ウイルス (MMTV) プロモーター等をあげることができる。宿主細胞が出芽酵母である場合にはADHIプロモーターなどをあげることができる。また、宿主細胞において機能するプロモーターをあらかじめ保有する基本ベクターを使用する場合には、ベクター保有のプロモーターと本発明遺伝子とが機能可能な形で結合するように、該プロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すればよい。例えば、前述のプラスミドpRc/RSV、pRc/CMV等は、動物細胞で機能可能なプロモーターの下流にクロニング部位が設けられており、該クロニング部位に本発明遺伝子を挿入し動物細胞へ導入することにより、本発明遺伝子を発現させることができる。これらのプラスミドにはあらかじめSV40の自律複製起点 (ori) が組み込まれているため、oriを欠失したSV40ゲノムで形質転換された培養細胞、例えばCOS細胞等に該プラスミドを導入すると、細胞内でプラスミドのコピー数が非常に増大し、結果として該プラスミドに組み込まれた本発明遺伝子を大量発現させることもできる。また前述の酵母用プラスミドpACT2はADHIプロモーターを有しており、該プラスミドまたはその誘導体のADHIプロモーターの下流に

本発明遺伝子を挿入すれば、本発明遺伝子を例えばCG1945 (Clontech社製) 等の出芽酵母内で大量発現させることが可能な本発明ベクターが構築できる。

【0008】構築された本発明ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明形質転換体を取得することができる。本発明ベクターを宿主細胞へ導入する方法としては、宿主細胞に応じた通常の導入方法を適用することができる。例えば、大腸菌を宿主細胞とする場合は、モレキュラー・クロニング第2版 (J. Sambrookら、コールド・スプリング・ハーバー、1989年) 等に記載される塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等の通常の方法を用いることができる。また、哺乳類動物細胞、魚類動物細胞または昆虫類動物細胞を宿主細胞とする場合は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、またはリポフェクション法等の一般的な遺伝子導入法に準じて前記細胞に導入することができる。酵母を宿主細胞とする場合は、例えばリチウム法を基にしたYeast transformation kit (Clontech社製) などを用いて導入することができる。尚、ウイルスをベクターに用いる場合には、上述のように一般的な遺伝子導入法によりウイルスのゲノムを宿主細胞に導入できるほか、本発明遺伝子の挿入されたウイルスのゲノムを含有するウイルス粒子を、宿主細胞へ感染させることによって、該ウイルスのゲノムを宿主細胞に導入することができる。

【0009】本発明形質転換体を選抜するには、例えば、本発明ベクターと同時にマーカー遺伝子を宿主細胞へ導入し、マーカー遺伝子の性質に応じた方法で細胞を培養すればよい。例えば、マーカー遺伝子が、宿主細胞に致死活性を示す選抜薬剤に対する薬剤耐性を付与する遺伝子である場合には、該薬剤を添加した培地を用いて、本発明ベクターが導入された宿主細胞を培養すればよい。薬剤耐性付与遺伝子と選抜薬剤の組み合わせとしては、例えば、ネオマイシン耐性付与遺伝子とネオマイシンの組み合わせ、ハイグロマイシン耐性付与遺伝子とハイグロマイシンの組み合わせ、ブラストサイジンS耐性付与遺伝子とブラストサイジンSとの組み合わせなどをあげることができる。また、マーカー遺伝子が宿主細胞の栄養要求性を相補する遺伝子である場合には、該栄養素を含まない最少培地を用いて、本発明ベクターが導入された細胞を培養すればよい。また、本発明遺伝子を宿主細胞で発現させることの可能な本発明ベクターを導入した場合には、エストロゲン結合活性に基づく検出方法を用いることもできる。本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を取得するには、例えば、本発明ベクターとマーカー遺伝子を有するベクターとを制限酵素等で消化することにより直鎖状にした後、これらを前述の方法で宿主細胞へ導入して該細胞を通常数週間培養し、導入されたマーカー遺伝子の発現を指標にして目的とする形質転換体を選抜し取得す

ればよい。また、例えば、上記のような選抜薬剤に対する耐性付与遺伝子をマーカー遺伝子として有する本発明ベクターを前述の方法で宿主細胞に導入し、該細胞を選抜薬剤が添加された培地で数週間以上該細胞を継代培養して、コロニー状に生き残った選抜薬剤耐性クローンを純化培養することにより、本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を選抜し取得することもできる。導入された本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に組み込まれたことを確認するには、当該細胞のゲノムDNAを通常の遺伝子工学的方法に準じて調製し、調製されたゲノムDNAから、導入された本発明遺伝子の部分塩基配列を有するDNAをプライマーやプローブとしたPCR、サザンハイブリダイゼーション等の方法を利用して、本発明遺伝子の存在を検出すればよい。該形質転換体は、凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することができるので、実験毎の形質転換体作製の手間を省くことができ、また、あらかじめ性質や取扱い条件の確認された形質転換体を用いて試験を実施することが可能となる。

【0010】上述のようにして得られた本発明形質転換体を培養することにより本発明レセプターを産生させることができる。例えば、本発明形質転換体が微生物である場合、該形質転換体は、一般微生物における通常の培養に使用される炭素源や窒素源、有機ないし無機塩等を適宜含む各種の培地を用いて培養することができる。培養は、一般微生物における通常の方法に準じて行い、固体培養、液体培養（旋回式振とう培養、往復式振とう培養、ジャーファーメンター（JarFermenter）培養、タンク培養等）などが可能である。培養温度および培地のpHは、微生物が生育する範囲から適宜選ぶことができ、例えば、約15℃～約40℃の培養温度にて、約6～約8の培地pHで培養するのが一般的である。培養時間は、種々の培養条件によって異なるが、通常約1日間～約5日間である。温度シフト型やIPTG誘導型等の誘導型のプロモーターを有する発現ベクターを用いた場合には誘導時間は1日間以内が望ましく、通常数時間である。また、上記形質転換体が哺乳類、魚類、昆虫類等の動物細胞である場合、該形質転換体は一般の培養細胞における通常の培養に使用される培地を用いて培養することができる。選抜薬剤を利用して当該形質転換体を作製した場合は、該選抜薬剤の存在下に培養するのが望ましい。哺乳類動物細胞の場合、例えば終濃度が10%となるようFBSを添加したDMEM培地（ニッスイ社製等）を用いて37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件で数日ごとに新しい培養液に交換しながら培養すればよい。細胞がコンフルエントになるまで増殖したら、例えば0.25% (w/v) 程度となるようトリプシンが添加されたPBS溶液を加えて個々の細胞に分散させ、数倍に希釈して新しいシャーレに播種し培養を続ける。昆虫類動物細胞の場合も同様に、例えば10% (v/v) FBSおよび2% (w/v) Yeastlateを含むGrace's medium等の昆虫細胞

用培養液を用いて培養温度25℃から35℃で培養すればよい。この際、Sf21細胞などのシャーレからはがれやすい細胞の場合は、トリプシン液を用いずピペッティングにより分散させ継代培養を行なうことができる。また、バキュロウイルス等のウイルスベクターを含む形質転換体の場合は、培養時間は細胞質効果が現れて細胞が死滅する前、例えばウイルス感染後72時間までとするのが好ましい。本発明形質転換体により産生された本発明レセプターの回収は、適宜、通常の単離、精製の方法を組み合わせれば良く、例えば、培養終了後、形質転換体の細胞を遠心分離等で集め、集められた該細胞を通常のバッファー、例えば20mMHEPES pH7, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5 mM PMSFからなるバッファーに懸濁した後、ポリトロン、超音波処理、ダウンスホモジナイザー等で破碎し、破碎液を数万xgで数十分間から1時間程度超遠心分離し、上清画分を回収することにより、本発明レセプターを含む画分を得ることができる。さらに、前記上清画分をイオン交換、疎水、ゲルろ過、アフィニティ等の各種クロマトグラフィーに供することにより、より精製された本発明レセプターを回収することもできる。この際、エストロゲン応答配列すなわちエストロゲンレセプターが結合する塩基配列を含む約15bpから約200bp程度の長さのオリゴヌクレオチドをプローブとしたDNA結合アッセイなどにより、本発明レセプターを含む画分を見分けることもできる。このようにして製造された本発明レセプターは、例えば、被験物のエストロゲンレセプターに対する結合能・結合量を評価するためのレセプターバインディングアッセイ等に用いることができる。

【0011】本発明遺伝子は、例えば、被験物のエストロゲンレセプター活性調節能を評価するためのレポーターアッセイに利用することができる。エストロゲンレセプター活性調節能としては、エストロゲンレセプターに対するアゴニスト活性、アンタゴニスト活性等があげられる。本発明遺伝子を用いたレポーターアッセイにおいて使用される「エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子」としては、具体的には例えば、エストロゲン応答配列を含むアフリカツメガエルのピテロジェニン遺伝子の転写制御領域等の下流に連結されたレポーター遺伝子、またはエストロゲン応答配列のコンセンサス配列 [5'-AGGTCAnnnTGACCTT-3'; nはA、G、CまたはTを示す。] と転写開始に必要な塩基配列とを含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子などをあげることができ、宿主細胞内でのエストロゲンレセプターの転写調節能をモニターするために用いることができる。レポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、βガラクトシダーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、成長ホルモン遺伝子などを利用することができ、宿主細胞における安定性が比較的高いレポーター蛋白質をコードする遺伝子



が好ましい。まず、本発明遺伝子と、エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子とを、例えばエストロゲンレセプター非内在性宿主細胞、具体的には例えばHeLa細胞、CV-1細胞、Hepal細胞、NIH3T3細胞、HepG2細胞、COS1細胞、BF-2細胞、C

HH-1細胞等に導入し形質転換体を作製する。ここで、本発明遺伝子は、例えば上述のように、宿主細胞で機能可能なプロモーターと機能可能な形で結合され基本ベクターに組み込まれた形で宿主細胞へ導入するとよい。エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子も、基本ベクターに組み込んで用いるとよい。また例えば、エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子が組み込まれたベクターと、宿主細胞で機能可能なプロモーターと機能可能な形で結合された本発明遺伝子を保有するベクターとを、マーカー遺伝子を有するベクターとともに宿主細胞に導入し、マーカー遺伝子の発現を指標にして選抜することにより、エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子、および宿主細胞で機能可能なプロモーターと機能可能な形で結合された本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる形質転換体を取得することができる。導入された本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に組み込まれたことを確認するには、当該細胞のゲノムDNAを通常の遺伝子工学的方法に準じて調製し、調製されたゲノムDNAから、導入された本発明遺伝子の部分塩基配列を有するDNAをプライマーやプローブとしたPCR、サザンハイブリダイゼーション等の方法を利用して、前記本発明遺伝子の存在を検出すればよい。該形質転換体は凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することができるので、これをいったん取得すると、アッセイのたびにこれらの遺伝子を宿主細胞に導入して新たな形質転換体を取得する必要がなく、また、形質転換体の性能も一定に保つことができることから、例えば自動化されたロボットによる大規模スクリーニングを実施する際にも有用である。上述のように作製された形質転換体を、例えば1日間から数日間培養する間に、被験物を培地中に加えて前記形質転換体と接触させ、該形質転換体における前記レポーター遺伝子の発現量を測定する。該形質転換体が産生するエストロゲンレセプターが被験物中のエストロゲン様活性物質の結合により活性化された場合は、レポーター遺伝子の転写が促進され、レポーター遺伝子にコードされた蛋白質が形質転換体の細胞内などに蓄積されるかもしくは培地中に分泌される。この蛋白質の量を測定することにより、該形質転換体の細胞あたりのレポーター遺伝子の発現量を測定する。具体的には、例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合は、細胞粗抽出物にルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを加えると、細胞抽出物中のルシフェラーゼ量に比例した強度で発光する。従って、この発光強

度をルミノメーターなどの測定装置で測定することにより、ルシフェラーゼの量、ひいては、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現量を知ることができる。同様にして、形質転換体に被験物を接触させない条件下におけるレポーター遺伝子の発現量を測定し、該発現量と、被験物を接触させた条件下におけるレポーター遺伝子発現量とを比較することにより、被験物中のエストロゲン様活性物質のエストロゲンレセプターに対するアゴニスト活性、すなわち、該レセプターの活性化能を評価することができる。また、例えば、上記の形質転換体に $17\beta$ -エストラジオール（以下、E2と記す。）等のエストロゲンを接触させた条件下、および、該エストロゲンと被験物とを同時に接触させた条件下にそれぞれ上記と同様の方法でレポーター遺伝子の発現量を測定する。形質転換体にエストロゲンを接触させた条件下におけるレポーター遺伝子の発現量と比較して、エストロゲンと被験物とを接触させた条件下におけるレポーター遺伝子の発現量が低ければ、この被験物はエストロゲンレセプターに対するアンタゴニスト活性、すなわち、該レセプターの抗活性化能を有すると評価することができる。

【0012】また、本発明遺伝子または本発明遺伝子の部分塩基配列を有するDNAを、細胞内のレポーター遺伝子の発現量を指標として、2種の融合蛋白質（ツーハイブリッド；two-hybrid）の複合体形成能および形成された複合体の転写調節能を検出することのできる試験系（ツーハイブリッドシステム；Nishikawa et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 154, 76-83 (1999)）に利用することができる。具体的には例えば、本発明遺伝子にコードされるエストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域と、リガンド依存的に該レセプターに結合可能な転写共役因子とが、リガンド依存的に複合体を形成することによりレポーター遺伝子の転写が活性化されるツーハイブリッドシステムにおいて、被験物の添加によるレポーター遺伝子の発現量の増減を測定することにより、被験物のエストロゲンレセプター活性調節能を評価することができる。エストロゲンレセプター活性調節能としては、エストロゲンレセプターに対するアゴニスト活性、アンタゴニスト活性等があげられる。かかるツーハイブリッドシステムとしては、例えば、下記の

(i) ~ (k) の遺伝子の各々が同一の宿主細胞に導入されてなる形質転換体をあげることができる。

(i) 宿主細胞内で機能可能な転写調節因子のDNA結合領域と、本発明レセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列が、宿主細胞内で機能可能なプロモーターの下流に接続されてなるキメラ遺伝子。

(j) 宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の転写活性化領域と、本発明レセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因子または該転写共役因子のレセプター結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列が、宿主細胞

胞内で機能可能なプロモーターの下流に接続されてなるキメラ遺伝子。

(k) (i) 記載のDNA結合領域が結合可能な塩基配列および(j) 記載の転写活性化領域により活性化され得るプロモーターの下流に、レポーター蛋白質をコードする塩基配列が接続されてなるレポーター遺伝子。宿主細胞としては、例えば、出芽酵母細胞や、HeLa細胞などの哺乳類動物細胞等があげられる。本発明レセプターに対する被験物の活性調節能を精度よく測定するためには、エストロゲンレセプター非内在性の細胞を使用することが好ましい。(i) 記載の「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子のDNA結合領域」としては、例えば、宿主細胞として出芽酵母細胞を使用する場合には、酵母由来の転写調節因子GAL4のDNA結合領域、バクテリア由来のリッザ-LexA等をあげることができる。これらをコードするDNAと、本発明遺伝子のDNAもしくは本発明遺伝子の部分塩基配列であってエストロゲンレセプターのリガンド結合領域をコードする塩基配列を有するDNAとを、その塩基配列の読み枠を合わせて連結することにより、「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子のDNA結合領域と、本発明レセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列」を有するDNAが得られる。なお、前記の「本発明遺伝子の部分塩基配列であってエストロゲンレセプターのリガンド結合領域をコードする塩基配列を有するDNA」としては、例えば、本発明遺伝子の塩基配列のうちのエストロゲンレセプターのリガンド結合領域をコードする塩基配列を含み、DNA結合領域をコードする塩基配列を含まない塩基配列からなるDNA等をあげることができる。具体的には例えば、配列番号2で示される塩基配列のうち、少なくとも塩基番号852～1638で表される塩基配列を含み、塩基番号1～783で表される塩基配列を含まない塩基配列をあげることができ、より具体的には、配列番号2で示される塩基配列の塩基番号784～1812で表される塩基配列を有するDNA等をあげることができる。また、(j) 記載の「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の転写活性化領域」としては、例えば、GAL4の転写活性化領域、大腸菌由来のB42酸性転写活性化領域等があげられる。

「本発明レセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因子」とは、本発明レセプターとリガンドとの複合体を認識してこれに結合可能な転写共役因子であって、具体的にはSRC1/NCOA1 (Onate, S. A. ら、Science, 1995, 270, 1354)、TIF2/GRIP1 (Voegel, J. J. ら、EMBO, J., 1996, 15, 3667) などがあげられる。前記のような転写活性化領域をコードするDNAと、前記転写共役因子もしくは該因子のレセプター結合領域をコードするDNAとを、その塩基配列の読み枠を合わせて連結することにより、

「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の転写活性化領域と、本発明レセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因子または該転写共役因子のレセプター結合領

域との融合蛋白質をコードする塩基配列」を有するDNAを得ることができる。尚、(i) および(j) 記載の融合蛋白質の構成を互いに入れ替えて、「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子のDNA結合領域と、本発明レセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因子または該転写共役因子のレセプター結合領域との融合蛋白質」および「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の転写活性化領域と、本発明レセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域との融合蛋白質」の組合せとしてもよい。これらの融合蛋白質をコードする塩基配列を、それぞれ「宿主細胞内で機能可能なプロモーター」の下流に接続することにより、(i) に記載のキメラ遺伝子および(j) に記載のキメラ遺伝子が得られる。このようなプロモーターとしては、例えば、宿主細胞が出芽酵母細胞である場合には、GAL1プロモーターのような誘導型プロモーターや、ADHプロモーターのような恒常的に発現するプロモーター等を使用することができる。(k) 記載のレポーター蛋白質としては、ルシフェラーゼ、分泌型アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、成長ホルモンなどを利用することができ、宿主細胞における安定性が比較的高いレポーター蛋白質が好ましい。かかるレポーター蛋白質をコードする塩基配列を、上記DNA結合領域が結合可能な塩基配列および上記転写活性化領域により活性化され得るプロモーターの下流に接続することにより、「(i) 記載のDNA結合領域が結合可能な塩基配列および(j) 記載の転写活性化領域により活性化され得るプロモーターの下流に、レポーター蛋白質をコードする塩基配列が接続されてなるレポーター遺伝子」が得られる。例えば、GAL4のDNA結合領域が結合可能な塩基配列としては、GAL1プロモーターのGAL4結合領域をあげることができ、LexAが結合可能な塩基配列としては、LexA結合領域があげられる。また、GAL4の転写活性化領域により活性化され得るプロモーターとしては、例えば、酵母由来の最小TATAbox配列があげられる。上述のようなキメラ遺伝子およびレポーター遺伝子を、例えばそれぞれベクターに挿入し、それらを同一の宿主細胞に導入して形質転換体を取得する。尚、宿主細胞が、利用可能な内在性のレポーター遺伝子を有する場合はそれを利用して良く、この場合はレポーター遺伝子の導入を省略することができる。また、ツーハイブリッドシステムを調製するための市販のキット、例えばMatchmaker Two-hybrid System (Clontech社製)、CheckMate Mammalian Two-Hybrid System (Promega) 等を利用して形質転換体を調製することもできる。本発明遺伝子にコードされるエストロゲンレセプターもしくは該レセプターのリガンド結合領域と、リガンド依存的に該レセプターに結合可能な転写共役因子とがリガンド依存的に複合体を形成することにより、レポーター遺伝子の転写が活性化されるツーハイブリッドシステムの構成の一例

としては、例えば、下記の(1)および(m)のキメラ遺伝子が、内在性のGAL1 UAS (upstream activating sequence)および酵母由来の最小TATA box配列の下流にLacZをコードする塩基配列が接続されてなるレポーター遺伝子を有する出芽酵母Y190株(Clontech社製)に導入された形質転換体をあげることができる。

(1) GAL4のDNA結合領域と、本発明レセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列が、ADHIプロモーターの下流に接続されてなるキメラ遺伝子。

(m) GAL4の転写活性化領域と本発明レセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因子TIF2またはTIF2のレセプター結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列が、ADHIプロモーターの下流に接続されてなるキメラ遺伝子。上述のように作製された形質転換体を、例えば数時間から数日間培養する間に、被験物を培地中に加えて前記形質転換体と接触させ、エストロゲンレセプターもしくは該レセプターのリガンド結合領域と、転写共役因子もしくは該因子のレセプター結合領域との複合体形成を惹起させ、その複合体の転写調節能を前記レポーター遺伝子の発現量を指標にして測定する。具体的には、例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合には、被験物を接触させた形質転換体から調製された細胞粗抽出物に、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを加えると、細胞粗抽出物中のルシフェラーゼ量に比例した強度で発光する。従って、この発光強度をルミノメーターなどの測定装置で測定することにより、ルシフェラーゼの量、ひいては、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現量を知ることができる。同様に、形質転換体に被験物を接触させない条件下におけるレポーター遺伝子の発現量を測定し、該発現量と、被験物を接触させた条件下における発現量とを比較することにより、被験物中のエストロゲン様活性物質のエストロゲンレセプターに対するアゴニスト活性、すなわち、該レセプターの活性化能を評価することができる。また、例えば、上記の形質転換体にE2等のエストロゲンに接触させた条件下、および、該エストロゲンと被験物とを同時に接触させた条件下にそれぞれ上記と同様の方法でレポーター遺伝子の発現量を測定する。形質転換体にエストロゲンを接触させた条件下におけるレポーター遺伝子の発現量と比較して、エストロゲンと被験物とを接触させた条件下におけるレポーター遺伝子の発現量が低ければ、この被験物はエストロゲンレセプターに対するアンタゴニスト活性、すなわち、該レセプターの抗活性化能を有すると評価することができる。

【0013】本発明レセプターを用いたレセプターバインディングアッセイは、該エストロゲンレセプターに対する化学物質の結合能の測定や結合量の定量的ほか結合特異性、結合力の分析などが可能な試験方法である。例えば、上述のようにして本発明形質転換体から回収され

た本発明レセプターに、標識されたりガンド(以下、標識リガンドと記す。)が結合しているところへ、被験物を共存させると、被験物と標識リガンドとの競合から、両者のレセプターへの親和性に依じて、標識リガンドがレセプターから遊離し、レセプターに結合した標識リガンドの量が減少し、よってレセプターに結合した標識量が減少する。従って、遊離型の標識リガンドの標識量または結合型の標識リガンドの標識量をモニターすることにより、被験物のレセプターへの結合能が間接的にわかる。標識リガンドとしては、例えば、トリチウム標識されたE2等を用いることができる。標識リガンドの結合型/遊離型の分離はヒドロキシアパタイト法やグリセロール密度勾配超遠心法などで行うことができる。反応系は大きく3群にわけられる。一つの系は、エストロゲンレセプターに標識リガンドが結合しているところへ溶媒のみが添加される群であり、被験物の濃度がゼロの系に相当し、この系から得られる結合型の標識リガンドの標識量は、標識リガンドのエストロゲンレセプターに対する総結合量を示す。もう一つの系は、エストロゲンレセプターに標識リガンドが結合しているところへ、例えば、標識されていないE2が、レセプターを十分飽和し標識リガンドが結合できなくなるだけの濃度(例えば $10\mu\text{M}$ )となるよう添加された系であり、この系から得られる結合型の標識リガンドの標識量は、標識リガンドのエストロゲンレセプターに対する非特異的な結合量と判断される。したがって、エストロゲンレセプターへの標識リガンドの特異的結合量は、総結合量からこの非特異的結合量を引いた値となる。3番目の系は、エストロゲンレセプターに標識リガンドが結合しているところへ、被験物が、例えば最終濃度 $10\mu\text{M}$ (この濃度は目的により任意に変更する。)となるよう添加された系である。被験物がエストロゲンレセプターへの結合能を有する場合は、この系から得られる結合型の標識リガンドの標識量は、上記のようにして求めた被験物濃度がゼロの時のエストロゲンレセプターへの標識リガンドの特異的結合量より小さくなる。このようにしてレセプターバインディングアッセイを行うことにより、本発明レセプターに対する被験物の結合能を調べることができ、被験物が複数の物質を含む場合にはその中にエストロゲンレセプターに親和性を示す物質が存在するかどうかを調べることもできる。さらに、本発明レセプターに対する被験物の結合能をより詳細に評価するには、例えば前記の3番目の系における被験物の添加濃度を変えて同様にアッセイを行い結合型の標識リガンドの標識量を測定する。該測定値に基づき、各アッセイにおける結合型と遊離型のリガンド量を算出して、例えばスキッチャード解析を行うことにより、被験物と本発明レセプターとの結合親和性、結合特異性、結合容量等を評価することができる。本発明のレポーターアッセイ、ツーハイブリッドシステムおよびレセプターバインディングアッセイは、化学物質の安

全性評価や、環境中のエストロゲン様活性物質の検出等に利用することができる。

#### 【0014】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。

#### 【0015】実施例1 本発明遺伝子の取得

ファットヘッドミノーの肝臓組織から、フェノールクロロホルム-イソアミルアルコール法(Plant Cell Physiol. 36(1):pp85-93(1995))に準じて全RNAを調製した。全RNAの収量は約2.3mgであった。該全RNA約500 $\mu$ gから、Oligotex(dT)<sub>30</sub>-Super(宝酒造社製)を用いて、poly(A)<sup>+</sup>RNAを調製した。poly(A)<sup>+</sup>RNAの収量は約12 $\mu$ gであった。次にGubler and Hoffman法に基づいてcDNAライブラリーを作製した。まず2.0 $\mu$ gのpoly(A)<sup>+</sup>RNA、Oligo(dT)<sub>18</sub>-リンカープライマー((GA)<sub>10</sub>ACGCGTCGACTCGAGCGGC GCGGACCG(T)<sub>18</sub>, XhoI認識配列を含む。)(宝酒造製)、RAV-2 RTase(宝酒造製)およびSuperScriptII RTase(Gibco-BRL社製)を用い、5-methyl dCTPを添加して1本鎖cDNAを合成した。得られた1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成した後、その末端を平滑化し、EcoRI-NotI-BamHIアダプター(宝酒造社製code4510)をライゲーションした。得られたDNAを制限酵素XhoIで消化して、スピンカラムに供して低分子量DNAを除去した後、EcoRIおよびXhoIで消化した $\lambda$ ZAPIIとライゲーションを行った。得られたDNAとin vitro packaging kit(Stratagene社製)を用いて、in vitro packagingを行い、ライブラリーを得た。該ライブラリーについて、宿主に大腸菌XL1 Blue MRF'株(Stratagene社製)を用いてタイトレーションを行ったところ、青色コロニーと白色コロニーの出現率からインサート含有率は約75%と推定された。次に、配列番号6で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号7で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを合成した。これらのオリゴヌクレオチドをプライマーに用いて、ファットヘッドミノーの肝臓から上記のように調製された2本鎖cDNAライブラリーを鋳型としてPCR(94℃1分間次いで55℃1分間さらに74℃2.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル)を行った。増幅された約400kbpのDNAを、pBluescriptII SK(+ )ベクター(Stratagene社製)のEcoRV部位を用いて作製されたTAクローニングベクターにクローニングし、得られたクローンの保有するベクターに挿入されたDNAの塩基配列を解析した。配列番号3で示される塩基配列を有するDNAを選択し、該DNAを、これを保有するクローンから精製した。次いで、精製されたDNAに、AlkPhos Direct system(アマシャムファルマシアバイオテク社製)を用いて、耐熱性アルカリフォスファターゼを直接標識することによりプローブを調製した。一方、上記のようにして調製されたライブラリーを大腸菌XL1 Blue MRF'株に導入し、直径150mmのLBプレート(1%バクトートリブ

トン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、1.5%寒天)に約50,000クローンずつプレーティングしてプラークを形成させた。このプレートを合計6枚準備して、合計300,000クローンを以下のスクリーニングに供した。各プレートから、Hybond N+メンブレン(アマシャムファルマシアバイオテク社製)にファージDNAをうつしとり、該メンブレンを変性液(1.5M NaCl、0.5N NaOH)に5分間、次いで中和液(1.5M NaCl、0.5M Tris-HCl(pH7.2)、1mM EDTA)に10分間浸した後、乾燥させ、さらに、80℃で2時間保温してDNAを固定した。得られたメンブレンと上記のプローブとを用いて、AlkPhos Direct systemのプロトコールにしたがってハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。すなわち、前記メンブレンを0.5M NaClを含むハイブリダイゼーション溶液(アマシャムファルマシアバイオテク社製、5ng $\mu$ l<sup>-1</sup>/ml)に浸し、55℃にて、16時間保温した。次いで、メンブレンを、一次洗浄バッファー(2M尿素、0.1%SDS、150mM NaCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.2%ブロッキング試薬を含む50mMナトリウムリン酸緩衝液、pH7.0)中にて60℃、10分間保温した後、一次洗浄バッファーを新しくして再度、65℃にて10分間保温した。このメンブレンを、さらに、二次洗浄バッファー(100mM NaCl、2mM MgCl<sub>2</sub>を含む50mMナトリウムリン酸緩衝液)中にて室温、5分間保温した後、二次洗浄バッファーを新しくして再度、室温にて5分間保温した。得られたメンブレンについて、AlkPhos Direct systemに含まれるCDP-Starを基質に用いて、該システムのマニュアルに従って処理を行うことにより、アルカリフォスファターゼが基質に作用して生ずる化学発光シグナルの検出を行った。フィルムにはHyperfilm ECL(アマシャムファルマシアバイオテク社製)を用いた。シグナルの強いものから順に10個の陽性クローンを選択した。選択された陽性クローンを滅菌済チップを用いて採取し、SMバッファー(50mM Tris-HCl(pH7.5)、100mM NaCl、MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O、0.01%ゼラチン)に懸濁して、4℃にて保存した。得られた陽性クローンを培養して直径約90mmのLBプレートに1,000~1,500クローンずつプレーティングして(合計10プレート)プラークを形成させ、前記と同様に、ハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。その結果、10の陽性クローンのうち、3クローンについて陽性のシグナルが得られたためこれら3クローンを採取した。次いで、これら3クローンを培養して直径約90mmのLBプレートに約200クローンずつプレーティングしてプラーク形成させ、前記と同様に、ハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。このスクリーニングにおいても陽性のシグナルが得られたクローンを3個単離した。これらの陽性クローンの保有するベクターから、 $\lambda$ ZAPIIベクターキット(ストラタジーン社製)添付のプロトコールにしたがい、in vivo excision systemを用いて、当該各ベクターに挿入されたDNAがpBluescript SK(-)にクローニングされてなるプラスミドを切り

出した。クローニングされた3種のDNAについて、Primer Walking法により、全塩基配列の解析を行った。その結果、その中の1種のDNAは、配列番号2で示される塩基配列の塩基番号458~1965で表される塩基配列を有し（以下、該DNAがpBluescriptSK(-)にクローニングされてなるプラスミドをA2209と記す。）、もう1種のDNAは、配列番号2で示される塩基配列の塩基番号1~1133で表される塩基配列を有する（以下、該DNAがpBluescriptSK(-)にクローニングされてなるプラスミドをA0902と記す。）ことが判明した。これらの塩基配列を、その共通する配列を重ねてつなぎあわせた結果、配列番号2で示される塩基配列が得られ、該塩基配列には配列番号1で示されるアミノ酸配列がコードされていることが判明した。プラスミドA2209が導入された大腸菌DH5 $\alpha$ 株は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERM BP-7103（受理日：平成12年3月27日）にてブタペスト条約下における国際寄託として保管されている。

#### 【0016】実施例2 動物細胞発現用の本発明ベクターの構築

RSVプロモーターを有するプラスミドpRc/RSV（Invitrogen社）のDNA2 $\mu$ gを、制限酵素Spe I（10U）およびXba I（10U）で、37℃にて終夜消化し、得られた消化物にさらにアルカリフォスファターゼ（BAP）5Uを65℃ 1時間反応させた。これをアガロース（アガロースS；ニッポンジーン社製）を用いたゲル電気泳動に供し、5~6kbpの長さを示すバンド部分のゲルからジーンクリーン（フナコシ社製）を用いてDNAを回収しベクターDNAとした。一方、ファットヘッドミノーの肝臓からTrizol試薬（GIBCO-BRL社製）を用いて該試薬の製品マニュアルに従い全RNAを調製した。調製された全RNAとRT-PCRkit（AMV ver2.1（宝酒造社製））に添付のランダムプライマーとを使用して、該キット添付のマニュアルに従いcDNAを作製した。作製されたcDNAを鋳型として、配列番号8で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドおよび配列番号9で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いてLA-Taq（宝酒造製）にてPCR（94℃ 1分間次いで53℃ 2分間さらに74℃ 2.0分間の保温を1サイクルとしてこれを25サイクル）を行い本発明遺伝子のDNAを増幅した。増幅されたDNAをクロロホルム/フェノール処理した後、エタノール沈殿により回収した。回収されたDNAを制限酵素Spe IおよびXba Iで37℃で5時間消化した。得られた消化物を、次いで、1%アガロースゲル電気泳動に供して分離し、約2.0kbpのDNAを含むゲル部分を切り出し、これに含まれるDNAをジーンクリーン（フナコシ社製）を用いて精製した。精製されたDNAの約100ngを上記のように調製したベクターDNA約50ngと混合し、Ligation kit ver.2（宝酒造社製）により16℃にて約3時間ライゲーションを行なった。この反応液中のDNAを大腸菌DH5 $\alpha$ 株コンピテントセル（TOYOBO製）に添付説明書に記載

の方法に従って導入した。アンピシリン耐性を示すコロニーからプラスミドDNAをアルカリ法で調製し、得られたプラスミドDNAの塩基配列を解析した。pRc/RSVのSpe I切断部位とXba I切断部位との間に本発明遺伝子が挿入された構造を有するプラスミドを選択し、プラスミドpRc/RSVFERM $\alpha$ とした。

#### 【0017】実施例3 本発明遺伝子を用いたレポーターアッセイ

##### （1）レポーターアッセイ用のレポータープラスミドの作製

Isogen試薬（ニッポンジーン社製）を用いて該試薬に添付のプロトコールに記載の方法で、アフリカツメガエルのゲノムDNAを精製した。精製されたゲノムDNAを鋳型として、Walkerらの報告（Nucleic acid Res. (1984) 12, 8611-8626）に準じてPCRを行なうことにより、アフリカツメガエルピテロゲニン遺伝子上流のTATAboxからエストロゲンレセプター応答配列までを含むDNAを増幅した。増幅されたDNAを回収し、その末端をBlunting kit（宝酒造社製）を用いて平滑化した（以下、該DNAをERE DNAと記す。）。マウスメタロチオネインI遺伝子のTATA box近傍の塩基配列とリーダー配列（Genbank Accession No. J00605）に由来する塩基配列を有する2本のオリゴヌクレオチド；すなわち、配列番号10で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号11で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをアニーリングさせて2本鎖DNAとし、これにT4ポリヌクレオチドカインースを作用させてその両末端をリン酸化した（以下、該DNAをTATA DNAと記す。）。一方、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドpGL3（プロメガ社製）を制限酵素Bgl IIおよびHind IIIで消化した後、これにBacterial alkaline phosphatase（BAP）を加えて65℃で1時間保温した。次いで、該保温液を低融点アガロース（Agarose L；ニッポンジーン社製）を用いた電気泳動に供し、pGL3由来のルシフェラーゼ遺伝子を含むBgl II-Hind III断片のDNAを回収した。回収されたDNA約100ngと、前記のTATA DNA 1 $\mu$ gとを混合し、T4リガーゼで結合させることによりプラスミドpGL3-TATAを作製した。次に、pGL3-TATAを制限酵素Sma Iで消化した後、BAPを加えて65℃で1時間保温した。該保温液を低融点アガロースゲル電気泳動に供し、バンド部分のゲルからDNAを回収した。回収されたDNA約100ngと、上記ERE DNA約1 $\mu$ gとを混合してT4リガーゼを反応させた後、該反応液中のDNAをDH5 $\alpha$ コンピテントセル（TOYOBO社製）へ導入した。アンピシリン耐性を示した大腸菌のコロニー数個からそれぞれの保有するプラスミドのDNAを調製し、これらを制限酵素Kpn IおよびXho Iで消化して得られた消化物をアガロースゲル電気泳動で分析した。pGL3-TATAのSma I部位にERE DNAが1コピー導入された構造を有するプラスミドをpGL3-TATA-EREと名付け、また、前記Sma I部位にERE DNAが5コピー導入された構造を有するプラスミ

ドをプラスミドpGL3-TATA-ERE x 5とした。

# 【0018】(2) 一過性発現系によるレポーターアッセイ

HeLa細胞を10cmプレートに約 $2 \times 10^6$ 細胞播種し、チャコールデキストラン処理済みFBS（以下、FBSと記す。）が10%となるよう添加されたE-MEM培地で、5%CO<sub>2</sub>条件下37℃にて1日間培養を行った。細胞に、Lipofectamine (Life Technologies社製)を用いてそのプロトコールに従い3.75 μgのpRc/RSVFMER αおよび3.75 μgのpGL3-TATA-ERE x 5を同時に導入した。37℃にて16時間培養後、培地を交換しさらに3時間培養した。その後、細胞を集めてFBSが10%となるよう添加されたE-MEM培地に懸濁して均一化し、予めDMSOで溶解した様々な濃度のエストラジオール（和光純薬社製、終濃度10pM~1 μM）、ビスフェノールA（和光純薬社製、終濃度100nM~10 μM）、ジエチルスチルベステロール（DES）（ナカライテスク社製、終濃度1nM~100nM）、ゲニステイン（和光純薬社製、終濃度100nM~10 μM）、またはp-ノニルフェノール（関東化学社製、終濃度100nM~10 μM）をそれぞれ添加した96穴プレート（DMSO終濃度0.1%）に播種した。細胞が播種された96穴プレートは37℃にて約40時間保温した後、5倍に希釈した細胞溶解剤PGC50（ニッポンジーン社製）を50 μl/wellずつ加えて、時々軽くゆすりながら室温にて30分間放置して細胞を溶解させた。このように調製された細胞溶解液を10 μlずつ96穴白色サンプルプレート（ベルトールド社製）に採取し、基質自動インジェクター付きのルミノメーターLB96p（ベルトールド社製）で50 μl/wellずつ酵素基質液PGL100（ニッポンジーン社製）を添加しながら直ちに発光量を5秒間測定した。結果を図1~5に示す。本発明遺伝子を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによって、被験物のエストロゲンレセプター活性化能を測定することができた。

# 【0019】(3) 本発明遺伝子が染色体に導入されたレポーターアッセイ用形質転換体の作製

プラスミドpUCSV-BSD（フナコシ社から購入）をBamHIで消化し、プラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAを調製する。調製されたDNAと、実施例3（1）記載のプラスミドpGL3-TATA-EREをBamHIで消化しBAP処理して得られたDNAとを混合して、T4リガーゼを反応させた後、該反応液中のDNAを大腸菌DH5 αコンピテントセル（TOYOBO製）に導入する。得られたアンピシリン耐性の大腸菌クローンからプラスミドDNAを調製し、それぞれを制限酵素BamHIで消化して得られた消化物をアガロースゲル電気泳動で分析する。プラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットがプラスミドpGL3-TATA-EREのBamHI切断部位に挿入された構造を有するプラスミドを選択し、プラスミドpGL3-TATA-ERE-BSDとする。次に、HeLa細胞に、上記のように作製されたプラスミドpGL3-TATA-ERE-BSDのDNA、および、実施例2で作製されたプラスミドpRc/RSVFMER αのDNAを、それぞ

れ直鎖化して導入し、これらのDNAが宿主細胞の染色体に導入されてなる形質転換体を取得する。プラスミドpGL3-TATA-ERE-BSDのDNA、および、プラスミドpRc/RSVFMER αのDNAをそれぞれSal Iで消化する。一方、HeLa細胞は、10%FBSを含むDMEM培地（日水製薬社製）を用いて37℃にて5%CO<sub>2</sub>存在下に、直径約10cmのシャーレ（ファルコン社製）を用いて培養する。約 $5 \times 10^5$ の細胞を1日間培養し、得られた細胞にリポフェクチン（GIBCO社製）を用いたリポフェクション法で、上記の直鎖化されたプラスミドのDNAを同時に導入する。リポフェクション法の条件はリポフェクチンに添付されたマニュアルの記載に従って、処理時間5時間、直鎖化されたプラスミドDNAの総量7 μg（各々3.5 μg）/シャーレ、リポフェクチン量は20 μl/シャーレとする。リポフェクション後、10%FBSを含むDMEM培地中でそのまま3日間培養する。次に、細胞をトリプシン処理でシャーレから剥がし、1/10量ずつ新しい10枚のシャーレに播種し、そのまま翌日まで培養する。次に、G418（SIGMA社製）を最終濃度400 μg/mlとなるように培養液に添加し、さらに、プラストサイジンSを最終濃度8 μg/mlとなるように添加して、培養を継続する。一週間後、前記と同じ濃度のG418およびプラストサイジンSを含む新しい培地に交換し、更に培養を継続する。一週間後、同じ操作を再度行う。さらに一週間後、倒立型顕微鏡でシャーレを観察し、直径数mmのコロニー30個をそれぞれ、あらかじめ培地を分注しておいた96穴ビュープレート（ベルトールド製）の各ウェルに移し、さらに培養を続ける。細胞をコンフルエントになる前にトリプシン処理により剥がして回収し、3等分して3枚の新しい96穴ビュープレートに播種する。1枚はそのまま継代と培養を続け、残り2枚の内の一方には最終濃度50nMとなるようE2を加え、もう一方には何も加えずに、それぞれを2日間培養する。2日後、それぞれの培養上清を除き、200 μl/wellのPBS(-)で細胞を2回洗浄した後、5倍に希釈したPGC50（ニッポンジーン社製）を20 μlずつ加えて、室温に30分間放置し細胞を溶解させる。このプレートを、酵素基質自動インジェクター付きルミノメーターLB96p（ベルトールド社製）にそれぞれセットし、50 μlの基質液PGL100（ニッポンジーン社製）を自動分注しながら、ルシフェラーゼ活性を測定する。E2が添加された系の方が、E2が添加されていない系に比べ、2倍以上高いルシフェラーゼ活性を示す形質転換体を選抜する。

# 【0020】(4) 本発明遺伝子が染色体に導入された形質転換体を用いるレポーターアッセイ

実施例3（3）にて作製されるHeLa細胞の形質転換体を24穴プレートに約 $4 \times 10^4$ 細胞/wellずつ播種し、10%のチャコールデキストラン処理済みFBS、400 μg/mlのG418および8 μg/mlのプラストサイジンSを含むE-MEM培地（以下、FBSおよび抗生物質含有E-MEM培地と記す。）

で、5%CO<sub>2</sub>条件下37℃にて1日間培養を行う。被験物のD

MSO (和光純薬社製) 溶液を該被験物の最終濃度が1nMから50 $\mu$ Mとなるよう添加したFBSおよび抗生物質含有E-MEM培地、前記の被験物溶液の替わりにそれと同量のDMSOを添加したFBSおよび抗生物質含有E-MEM培地、及びE2のDMSO溶液をE2の最終濃度が1 $\mu$ Mとなるよう添加したFBSおよび抗生物質含有E-MEM培地を調製し、これを前記の細胞の培養上清と交換する。該細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーター中で培養し、24時間後に培養上清を除き、ウェルに接着している細胞を剥がさないように1ml/ウェルのPBS

(一) でウェルを2回洗浄し、5倍に希釈した細胞溶解剤PGC 50 (ニッポンジーン社製) を50 $\mu$ l/wellずつ加えて、時々軽くゆすりながら室温にて30分間放置して細胞を溶解させる。このように調製された細胞溶解液を10 $\mu$ lずつ96穴白色サンプルプレート (ベルトールド社製) に採取し、基質自動インジェクター付きのルミノメーターLB 96p (ベルトールド社製) で50 $\mu$ l/wellずつ酵素基質液PGL100 (ニッポンジーン社製) を添加しながら直ちに発光量を5秒間測定する。このような本発明遺伝子が染色体に導入された形質転換体を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによって、エストロゲンレセプター活性化能を有する物質を含む被験物を見出すことができる。

【0021】実施例4 本発明遺伝子を利用したツーマイブリッドシステム

(1) 本発明レセプターのリガンド結合領域と転写調節因子のDNA結合領域との融合蛋白質をコードするキメラ遺伝子を含有するベクターの作製

プラスミドA2209を鋳型として、配列番号12で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号13で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いてPCR (94℃ 1分間次いで55℃ 1分間さらに74℃ 1.5分間の保温を1サイクルとしてこれを25サイクル) を行うことにより、配列番号2で示される塩基配列の塩基番号784~1812で表される塩基配列を有し本発明レセプターのリガンド結合領域をコードするDNAを増幅した。増幅されたDNAは、クロロホルム/フェノール処理の後、エタノール沈殿し、70%エタノールにより遠心洗浄した後乾燥させた。このDNAにTEを加えて溶解させた後、制限酵素EcoRIとSal Iとで37℃にて約5時間消化した。消化物を1%アガロースゲル電気泳動に供して分離し、約1kbpのDNAを含むゲル部分を切り出し、これに含まれるDNAをジーンクリーン (フナコシ社製) を用いて回収した。一方、GAL4蛋白のDNA結合領域とのキメラ蛋白作製用ベクターpGBT9 (Clontech社製) (約50ng) をEcoRIおよびSal Iで消化した後、アガロースゲル電気泳動に供して、EcoRIおよびSal Iで消化されたベクターDNAをジーンクリーン (フナコシ社製) を用いて回収した。該ベクターDNAと前記回収DNA約10ngとを混合し、同容量のライゲーション液 (宝酒造製ライゲーションキット) を加え、16℃で約5時間保温し、次いでコンピテントセルDH5 $\alpha$  (TOYOBO社製) に添付説明書に記載の方法

に従って導入した。アンピシリン耐性を示すコロニーを単離して該コロニーからプラスミドDNAをアルカリ法で調製した。得られたプラスミドの塩基配列を確認し、これをpGBT9-FMER $\alpha$ LIDと名付けた。このプラスミドは、宿主細胞として出芽酵母細胞を用いたツーマイブリッドアッセイに使用することができる。

【0022】(2) 転写共役因子のレセプター結合領域と転写調節因子の転写活性化領域との融合蛋白質をコードするキメラ遺伝子を含有するベクターの作製  
ヒト脳由来mRNA (Clontech社製) とRT-PCRキット (宝酒造製) を用いて製品添付のプロトコールに従いcDNAを作製した。作製されたcDNAを鋳型として、配列番号14で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドおよび配列番号15で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーに用いてPCR (94℃で1分間次いで55℃で1分間さらに72℃で2.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル) を行い、転写共役因子TIF2のアミノ末端から624番目のアミノ酸から1287番目のアミノ酸までのアミノ酸配列をコードするDNAを増幅した。増幅されたDNAは、クロロホルム/フェノール処理の後、エタノール沈殿し、70%エタノールにより遠心洗浄した後乾燥させた。このDNAにTEを加えて溶解させた後、制限酵素EcoRIとBgl IIとで37℃で5時間消化した。消化物を1%アガロースゲル電気泳動に供して分離し、約2.0kbpのDNAを含むゲル部分を切り出し、これに含まれるDNAをジーンクリーン (フナコシ社製) を用いて精製した。一方、GAL4蛋白の転写活性化領域とのキメラ蛋白作製用ベクターpGAD424 (Clontech社製) (約50ng) をEcoRIおよびBamHIで消化した後、アガロースゲル電気泳動に供して消化されたベクターDNAをジーンクリーン (フナコシ社製) を用いて回収した。回収されたベクターDNAと前記精製DNA約10ngとを混合し、同容量のライゲーション液 (宝酒造製ライゲーションキット) を加え、16℃で約1時間保温し、次いでコンピテントセルDH5 $\alpha$  (TOYOBO社製) に添付説明書に記載の方法に従って導入した。アンピシリン耐性を示すコロニーを単離して該コロニーからプラスミドDNAをアルカリ法で調製した。得られたプラスミドは、塩基配列を確認した後、pGAD424-TIF2RIDと名付けた。このプラスミドは、宿主細胞として出芽酵母細胞を用いたツーマイブリッドアッセイに使用することができる。

【0023】(3) 出芽酵母細胞を宿主細胞とするツーマイブリッドシステムの作製

酵母Y190 (Clontech社製) をMatchmaker Two-Hybrid System (Clontech社製) のマニュアルに従いYPD培地で30℃にて終夜振盪培養した。該酵母を集菌後、その細胞内に、実施例4 (1) 記載のpGBT9-FMER $\alpha$ LIDと実施例4 (2) 記載のpGAD424-TIF2RIDとを、Yeastmaker yeast transformation system (Clontech社製) を用いて導入した。前記プラスミドの導入された酵母細胞は、トリブ



トファンおよびロイシンを含まないSD寒天培地上に播き、30℃で約2日間培養した。次いで、コロニーを選択し再びトリプトファンおよびロイシンを含まないSD寒天培地上に塗布し、30℃で約2日間培養した。

【0024】(4) 酵母ツーハイブリッドシステムを用いた被験物のエストロゲンレセプター活性調節能の測定  
実施例4(3)で培養された酵母の一部を、トリプトファンおよびロイシンを含まないSD培地1mlに植菌し、30℃で終夜振盪培養し、得られた培養液を、トリプトファンおよびロイシンを含まないSD培地で595nmの吸収が0.015となるように希釈した。96穴のディープウェルプレートの各ウェルにトリプトファンおよびロイシンを含まないSD培地250μlを加え、さらにDMSOに溶解したE2(和光純薬社製、終濃度1pM~10μM)、ビスフェノールA(和光純薬社製、終濃度10nM~10μM)、ジエチルステルベステロール(DES)(ナカライテスク社製、終濃度10pM~10μM)、ゲニステイン(和光純薬社製、終濃度10nM~10μM)またはp-ノニルフェノール(関東化学社製、終濃度10nM~10μM)を加え(いずれもDMSOの終濃度が1%となるよう調製した。)、ここへ上記培養酵母希釈液10μlを添加して、30℃で4時間振盪培養した。次いで、各ウェルから培養液10μlを回収し、これに100μlのβガラクトシダーゼ活性測定用発光反応液(Gal-Screen, Tropix社製)を加え、約1時間室温で保温した後、ルミノメーターLB96p(ベルトールド社製)で発光量を測定した。このようにして得られた各被験物のエストロゲンレセプター活性調節能の測定結果を図6~10に示す。

【0025】実施例5 本発明遺伝子を含有するウイルス粒子およびウイルスベクターの作製

実施例2にて調製された本発明ベクターpRc/RSVFMERαのDNA2μgを10Uの制限酵素SpeIおよびXbaIで37℃にて1時間消化した後、低融点アガロースゲル電気泳動に供し約1.8kbpのDNAを回収する。このDNAをblunting kit(宝酒造製)を使用してマニュアルに従い平滑化する。一方、2μgのpVL1392ベクターDNAを10Uの制限酵素SmaIで消化し、10Uのアルカリフォスファターゼで65℃にて1時間処理した後、低融点アガロースゲル電気泳動に供しDNAを回収する。回収されたpVL1392ベクターDNA100ngに、上記のようにpRc/RSVFMERαから調製された約1.8bpのDNAの約100ngを加え、5UのT4 Ligaseを添加して16℃にて3時間保温する。これをE.coli DH5α株のコンピテントセル(TOYOBO社製)に添付説明書に記載の方法に従って導入し、得られたコロニーからプラスミドDNAをアルカリ法で調製する。それぞれのプラスミドDNA約1μgを10Uの制限酵素XbaIで37℃にて1時間消化した後、アガロースS(ニッポンジーン社製)を用いたアガロース電気泳動で分析する。約1.7kbpのバンドが検出されるプラスミドをトランスファーベクターpVL1392-FMERαとする。1×10<sup>6</sup>個のSf21細胞(ATCCから入手)を75cm

2のT型フラスコ(ファルコン社製)中で10%FBSおよび2%Yeastlateを含むGrace's medium(以下、FBS含有Grace培地と記す。)を用いて27℃にて一晚培養する。一方、上記のトランスファーベクターpVL1392-FMERαのDNA10μgと、直鎖状に調製されたウイルスゲノムDNA Baculo gold(Pharmlingen社製)20ngとをGrace's medium 100μlに添加し、滅菌水で2倍に希釈したりボフェクチン(GIBC0社製)10μlを加え、室温にて30分間放置する。一晚培養された前記のSf21細胞の培養上清を除き、血清を含まないGrace's medium少量で細胞を洗った後、同培地5mlを細胞に添加し、これに前記のリボフェクチン-DNA混合液を全量加え、27℃にて3時間保温する。次いで、FBS含有Grace培地で細胞を洗った後、FBS含有Grace培地20mlを細胞に添加し、5日間27℃にて培養する。5日目に培養上清を回収して50ml容の遠心チューブに採り、5000xgで15分間遠心分離することにより細胞の破片を沈殿させ、遠心上清を回収する。この上清全量を100,000xgで24時間遠心分離し、本発明遺伝子を含有するウイルス粒子を沈殿として得る。この沈殿を100μlのTEに懸濁し、当量のTE飽和フェノールを加え、穏やかに室温にて24時間混合する。これを10,000xg、10分間遠心分離した後、水層を回収し、これに当量のクロロホルムを加え10分間穏やかに混合し、再度10,000xg、10分間の遠心分離を行う。水層を回収し、該水層に終濃度0.2Mとなる量のNaClと2.5倍量のエタノールを加え、本発明遺伝子を保有するウイルスベクターのDNAを沈殿として回収する。

【0026】実施例6 本発明遺伝子を含有するウイルスベクターがSf21細胞へ導入された形質転換体の作製と本発明レセプターの製造

Sf21細胞(ATCCから入手)を75cm<sup>2</sup>のT型フラスコ(ファルコン社製)に1×10<sup>6</sup>個ずつ計10枚播種し、27℃にてFBS含有Grace培地で培養する。この細胞に、実施例5のように調製される本発明遺伝子を含有するウイルス粒子を含む培養上清を10μl/フラスコの割合で加え、そのまま4日間培養する。このフラスコから培養上清を採取し、これを、前記と同様に75cm<sup>2</sup>のT型フラスコ(ファルコン社製)10枚に培養したSf21細胞へ、フラスコ一枚あたり1mlずつ加え、60時間培養する。60時間後、細胞をピペッティングにより懸濁してフラスコより回収し、得られた細胞懸濁液を5,000xgで15分間遠心分離し沈殿とする。この細胞の沈殿を20mM HEPES pH7, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSFからなるバッファーに懸濁した後、得られる懸濁液をダウンス型ガラスホモジナイザーで上下に30回ホモジナイズし細胞を破碎する。この破碎液を30,000xgで1時間遠心分離して上清画分を回収することにより、本発明レセプターを含む画分を得る。

【0027】実施例7 本発明レセプターを用いたレセプターバインディングアッセイ

結合反応バッファーは、最終組成が20mM HEPES-KOH pH 7.9, 10mM モリブデン酸ナトリウム, 1mM DTT, 0.5mM EDTA,



0.5mM PMSFとなるように調製する。反応系は総容量を100 $\mu$ lとし、実施例6にて調製される本発明レセプターを含む画分を10 $\mu$ g蛋白質相当量添加し、さらに、トリチウム標識されたE2を1pMから100nM程度になるよう添加する。非特異的結合を調べるための試験区には標識されていないE2を最終濃度10 $\mu$ Mになるようにさらに加える。結合反応は、以下のように行う。反応液を氷上で15時間保温した後、チャコールデキストラン液[組成: 10mM Tris-HCl, 0.2%の酸洗活性炭(ナカライテスク社製NoritA)、0.005%ファルマシアDextran T70]を100 $\mu$ l加え、10分間氷上に放置する。この反応液を低速遠心機で1,000xgで10分間遠心分離して活性炭を沈殿させ、上清を100 $\mu$ l分取し、その放射エネルギーを液体シンチレーションカウンターで測定する。この測定値を基に、該上清画分中の標識E2量、すなわち、レセプターに結合した標識E2量(結合型標識リガンド量)を求める。標識E2のみが添加された試験区の結合型標識リガンド量は、標識E2のレセプターに対する全結合量に相当する。一方、標識E2に加え標識されていないE2が添加された試験区の結合型標識リガンド量は、標識E2のレセプターに対する非特異的結合量に相当する。各種濃度の標識E2が添加された反応系それぞれについて、全結合量から非特異的結合量を差し引いて、その反応系における標識リガンドのレセプターに対する特異的結合量を求める。次いで、Y軸に(特異的結合標識リガンド濃度/遊離標識リガンド濃度)、X軸に特異的結合標識リガンド濃度をプロットし、スキャッチャード解析することにより、本発明レセプターのE2に対するKd値を求める。本発明レセプターに対する被験物の親和性を測定するには、上記と同様にして1nM程度のトリチウム標識E2が入っているバインディングアッセイ結合反応液へ、被験物を終濃度が1%程度となるよう添加する。なお被験物が添加されない系には、被験物に換えてそれと同量の溶媒を系に加える。被験物添加によりレセプターに対する標識E2の結合量が低下する場合は、その被験物にはエストロゲンレセプターに結合する物質が含まれると判断される。

#### 【0028】

【発明の効果】本発明により、化学物質のエストロゲンレセプター活性調節能を評価するための試験系に利用することのできる新たなエストロゲンレセプター遺伝子等\*

<110> Sumitomo Chemical Company Limited

<120> Estrogen receptor gene

<130> P152178

<150> JP 2000/106253

<151> 2000-04-07

<160> 15

<210> 1

\*が提供可能となる。

#### 【0029】[配列表フリーテキスト]

配列番号4

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号5

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号6

10 PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号7

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号8

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号9

20 PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号10

プロモーターDNAを作製するために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号11

プロモーターDNAを作製するために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号12

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

30 配列番号13

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号14

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号15

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

#### 【0030】

#### 【配列表】

&lt;211&gt; 602

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Pimephales promelas

&lt;400&gt; 1

Met	Ser	Gly	Gly	Gln	Thr	Ser	Gly	Glu	Ala	Ala	Gly	Thr	Arg	Gln	Arg
1				5					10					15	
His	Arg	Thr	Asn	Leu	Asn	Pro	Glu	Arg	Glu	Asp	Leu	Glu	Gly	Leu	Ser
			20					25					30		
Ser	Pro	Pro	Thr	Ala	His	Lys	Leu	Ser	Pro	Met	Tyr	Pro	Lys	Glu	Glu
		35					40					45			
His	Ser	Ala	Glu	Gly	Ile	Ser	Ser	Ser	Val	Asn	Tyr	Leu	Asp	Gly	Ala
	50					55					60				
Tyr	Glu	Tyr	Pro	Asp	Pro	Thr	Gln	Thr	Tyr	Gly	Thr	Thr	Ser	Pro	Ala
65					70					75				80	
Glu	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Pro	Thr	Asp	His	His	Ala
				85					90					95	
Pro	Pro	Val	Glu	Glu	His	Met	Gln	Thr	Phe	Ser	Gly	Glu	Ser	Ser	Ser
		100						105					110		
Pro	Leu	Met	Phe	Ala	Pro	Thr	Ser	Pro	Gln	Leu	Ser	Pro	Tyr	Leu	Ser
	115						120					125			
His	His	Gly	Gly	His	His	Ser	Thr	His	Gln	Val	Ser	Tyr	Tyr	Leu	Asp
	130					135					140				
Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Tyr	Arg	Ser	Ser	Val	Val	Ser	Ser	Gln	Gln
145					150					155				160	
Ala	Gly	Val	Gly	Leu	Cys	Glu	Val	Leu	Cys	Ser	Ala	Thr	Asp	Arg	Gln
			165					170				175			
Glu	Met	Tyr	Thr	Gly	Ser	Arg	Ala	Ala	Gly	Gly	Phe	Asp	Ser	Glu	Lys
	180							185				190			
Glu	Thr	Arg	Phe	Cys	Ala	Val	Cys	Ser	Asp	Tyr	Ala	Ser	Gly	Tyr	His
	195						200				205				
Tyr	Gly	Val	Trp	Ser	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Ala	Phe	Phe	Lys	Arg	Ser
	210				215						220				
Ile	Gln	Gly	His	Asn	Asp	Tyr	Val	Cys	Pro	Ala	Thr	Asn	Gln	Cys	Thr
225				230						235				240	
Ile	Asp	Arg	Asn	Arg	Arg	Lys	Ser	Cys	Gln	Ala	Cys	Arg	Leu	Arg	Lys
			245						250			255			
Cys	Tyr	Glu	Val	Gly	Met	Met	Lys	Gly	Gly	Ile	Arg	Lys	Asp	Arg	Gly
		260						265			270				
Gly	Arg	Ala	Ile	Arg	Arg	Glu	Arg	Arg	Lys	Ser	Asp	Asn	Glu	Asp	Arg
	275						280				285				
Asp	Lys	Ser	Tyr	Ser	Glu	Gln	Ser	Gly	Arg	Val	Gly	Leu	Arg	Thr	Pro
	290					295					300				
Gln	Asp	Lys	Arg	Lys	Lys	Ser	Ser	Ala	Glu	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Cys
305				310						315				320	
Met	Pro	Pro	Asp	Gln	Val	Leu	Val	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Glu	Pro	Pro
			325						330				335		
Ala	Val	Cys	Ser	Arg	Gln	Lys	His	Ser	Pro	Pro	Tyr	Thr	Glu	Ile	Thr
		340						345				350			
Met	Met	Ser	Leu	Leu	Thr	Asn	Met	Ala	Asp	Lys	Glu	Leu	Val	His	Met

33		34
355	360	365
Ile Ala Trp Ala Lys Lys Val Pro Gly Phe Gln Asp Leu Ser Leu His		
370	375	380
Asp Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile		
385	390	395
Gly Leu Ile Trp Arg Ser Ile His Ser Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala		
405	410	415
Gln Asp Leu Ile Leu Asp Arg Asn Glu Gly Glu Cys Val Glu Gly Met		
420	425	430
Ala Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Arg Leu Arg Ser		
435	440	445
Leu Lys Leu Lys Leu Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu		
450	455	460
Leu Asn Ser Gly Ala Phe Ser Phe Cys Ser Ser Pro Val Glu Pro Leu		
465	470	475
Met Asp Ser Phe Met Val Gln Cys Met Leu Asp Asn Ile Thr Asp Ala		
485	490	495
Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Lys Ser Gly Ala Ser Leu Gln Leu Gln Ser		
500	505	510
Arg Arg Gln Ala Gln Leu Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met		
515	520	525
Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr His Met Lys Cys Lys Asn Arg		
530	535	540
Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asp Ala Gln Arg Phe		
545	550	555
Gln Ser Pro Gly Glu Val Gln Arg Leu Gly Ala Gln Ser Glu Lys Asp		
565	570	575
Pro Pro Ser Thr Pro Pro Thr Arg Gly Pro Gly Ala Met Gln Pro Asn		
580	585	590
Thr Gly Cys Leu Ser Gln Ser Pro Asp Pro		
595	600	

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1965

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pimephales promelas

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (4)... (1812)

40

&lt;400&gt; 2

gtg atg tct gga ggg cag acc agc gga gag gct gct ggt acc agg cag	48
Met Ser Gly Gly Gln Thr Ser Gly Glu Ala Ala Gly Thr Arg Gln	
1	5
cga cac agg acc aac ctg aac ccg gag aga gaa gac ctg gag gga ctt	96
Arg His Arg Thr Asn Leu Asn Pro Glu Arg Glu Asp Leu Glu Gly Leu	
20	25
tcg tca ccg ccc act gcc cac aaa ctg tct atg tac ccc aag gag	144
Ser Ser Pro Pro Thr Ala His Lys Leu Ser Pro Met Tyr Pro Lys Glu	
35	40
	45

35	36
gag cac agc gca gag ggc atc agc tcc tct gtc aat tac ctt gat gga Glu His Ser Ala Glu Gly Ile Ser Ser Ser Val Asn Tyr Leu Asp Gly	192
50 55 60	
gct tat gag tac cca gac ccc aca cag acc tat ggc acc acg tca ccc Ala Tyr Glu Tyr Pro Asp Pro Thr Gln Thr Tyr Gly Thr Thr Ser Pro	240
65 70 75	
gca gag cct ctc tct gtc gga tac ttc ctg gct ccc acg gac cac cac Ala Glu Pro Leu Ser Val Gly Tyr Phe Leu Ala Pro Thr Asp His His	288
80 85 90 95	
gca ccc cct gtc gaa gaa cai atg cag acg ttc agc gga gaa tcc agc Ala Pro Pro Val Glu Glu His Met Gln Thr Phe Ser Gly Glu Ser Ser	336
100 105 110	
agc cct ctc atg ttt gca ccc acc agc cct cag ctg tcc ccg tac ctg Ser Pro Leu Met Phe Ala Pro Thr Ser Pro Gln Leu Ser Pro Tyr Leu	384
115 120 125	
agc cai cai gga gga cac cac tcg acc cac cag gtg tcc tac tac ctg Ser His His Gly Gly His His Ser Thr His Gln Val Ser Tyr Tyr Leu	432
130 135 140	
gac acc tcg tct agc aca gtc tac agg tcc agt gtg gtg tct tct cag Asp Thr Ser Ser Ser Thr Val Tyr Arg Ser Ser Val Val Ser Ser Gln	480
145 150 155	
cag gca ggt gti ggt ctg tgi gag gtg ttg tgc agt gcg act gac agg Gln Ala Gly Val Gly Leu Cys Glu Val Leu Cys Ser Ala Thr Asp Arg	528
160 165 170 175	
cag gag atg tac acc gga tca aga gct gca gga gga ttt gat tca gag Gln Glu Met Tyr Thr Gly Ser Arg Ala Ala Gly Gly Phe Asp Ser Glu	576
180 185 190	
aag gag acg cgc ttc tgt gcg gtg tgc agt gac tat gct tcc ggc tat Lys Glu Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys Ser Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr	624
195 200 205	
cai tat gga gtc tgg tcc tgt gag gga tgc aaa gct ttc ttc aag aga His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg	672
210 215 220	
agc att cag ggt cac aat gac tat gtt tgt cca gca acc aac cag tgc Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Val Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys	720
225 230 235	
act att gac aga aac cgc agg aag agc tgc caa gca tgc aga cta cgc Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg	768
240 245 250 255	
aag tgt tat gaa gta ggc atg atg aaa gga ggt att cgt aaa gac cgc Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Ile Arg Lys Asp Arg	816
260 265 270	
ggt ggc cgc gct atc agg cgt gag cgg agg aag agc gat aat gag gat Gly Gly Arg Ala Ile Arg Arg Glu Arg Arg Lys Ser Asp Asn Glu Asp	864
275 280 285	
cgt gac aag agc tac agt gag cag tca ggc cgt gtt gga ctg agg aca Arg Asp Lys Ser Tyr Ser Glu Gln Ser Gly Arg Val Gly Leu Arg Thr	912
290 295 300	
ccf cag gac aag agg aag aag agc agc gcc gag gtg gtc agt gct tta Pro Gln Asp Lys Arg Lys Lys Ser Ser Ala Glu Val Val Ser Ala Leu	960

37	38
305	310
1008	315
1056	320
1104	325
1152	330
1200	335
1248	340
1296	345
1344	350
1392	355
1440	360
1488	365
1536	370
1584	375
1632	380
1680	385
1728	390
1776	395
	400
	405
	410
	415
	420
	425
	430
	435
	440
	445
	450
	455
	460
	465
	470
	475
	480
	485
	490
	495
	500
	505
	510
	515
	520
	525
	530
	535
	540
	545
	550
	555
	560
	565
	570
	575

39 40  
 Asp Pro Pro Ser Thr Pro Pro Thr Arg Gly Pro Gly Ala Met Gln Pro  
 580 585 590  
 aac act ggc tgt ctc agc caa agt cca gac cca tga cctatgtacc acatac 1828  
 Asn Thr Gly Cys Leu Ser Gln Ser Pro Asp Pro  
 595 600  
 aatcccaaca gctgcagaat gigaagactg ccaatcagga ataagaactg tgattcaaaa 1888  
 caacggigga gtcctcctt gtgcctatc agagtacact itagatttta atctagaaal 1948  
 taactcattt gaaaatt 1965  
 <210> 3  
 <211> 408 10  
 <212> DNA  
 <213> Pimephales promelas  
 <400> 3  
 aggagcatcc aaggtcacaa tgactacgtt tgcacagcaa ccaaccagtg cactattgac 60  
 agaaacgca ggaagagctg ccaagcatgc agactacgca agtattalga agtaggcatg 120  
 atgaaaggag gtattcgtaa agaccgcggt ggccgcgcta tcaggcgiga gcggaggaag 180  
 agcgataatg aggatcgtga caagagctac agtgagcagt caggccgtgt tggactgagg 240  
 acacctcagg acaagaggaa gaagagcagc gccgaggigg tcagtgcctt atgcatgcca 300  
 cctgaccagg tgcctgggtt gcttcgggt gcagagccac cggtgtctg itcacgtcag 360  
 aagcacagcc ccccgtaac cgaggtcacc atgatgacc tgcacac 408  
 <210> 4  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR  
 <400> 4  
 gtgatgtctg gagggcagac cagcgga 27  
 <210> 5 30  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR  
 <400> 5  
 ctgcagctgt tgggattgta tgtg 24  
 <210> 6  
 <211> 27 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR  
 <400> 6  
 aggagcatcc aaggtcacaa tgactac 27  
 <210> 7  
 <211> 27  
 <212> DNA 50

41 42

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 7

ggtgagcagg gtcatcatgg tgacctc 27

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 8

gccactagtc caccatgtct ggagggcaga ccagcgga 38

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 20

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 9

aatattcaaa tgagttaatt t 21

<210> 10

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 30

<220>

<223> Designed oligonucleotide to synthesize promoter DNA

<400> 10

gatctcgact ataaagaggg caggetgtcc tctaagcgtc accacgactt ca 52

<210> 11

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 40

<223> Designed oligonucleotide to synthesize promoter DNA

<400> 11

agcttgaagt cgtggtagcg cttagaggac agcctgccct ctttatagtc ga 52

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

43

<400> 12

gccgaattcg gcatgatgaa aggaggtatt 30

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 13 10

gccgtcgact catgggtctg gactttggct 30

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 14 20

gccgaattcg agagagctga cgggcagagc aga 33

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 15

gccagatctg ctcatagttg ctggcatacc act 33

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明遺伝子を用いたレポーターアッセイにより、E2のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸は、各試験区におけるエストラジオールの濃度を示し、左端の0のカラムは、E2のDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区（E2無添加区）を示す。縦軸は、ルシフェラーゼ活性値を、E2無添加区のルシフェラーゼ活性値を100として示す。

【図2】本発明遺伝子を用いたレポーターアッセイにより、ビスフェノールAのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸は、各試験区におけるビスフェノールAの濃度を示し、左端の0のカラムは、ビスフェノールAのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区（ビスフェノールA無添加区）を示す。縦軸は、ルシフェラーゼ活性値を、ビスフェノールA無添加区のルシフェラーゼ活性値を100として示す。

【図3】本発明遺伝子を用いたレポーターアッセイにより、ジエチルスチルベステロール（DES）のエストロ

ゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸は、各試験区におけるDESの濃度を示し、左端の0のカラムは、DESのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区（DES無添加区）を示す。縦軸は、ルシフェラーゼ活性値を、DES無添加区のルシフェラーゼ活性値を100として示す。

【図4】本発明遺伝子を用いたレポーターアッセイにより、ゲニステインのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸は、各試験区におけるゲニステインの濃度を示し、左端の0のカラムは、ゲニステインのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区（ゲニステイン無添加区）を示す。縦軸は、ルシフェラーゼ活性値を、ゲニステイン無添加区のルシフェラーゼ活性値を100として示す。

【図5】本発明遺伝子を用いたレポーターアッセイにより、p-ノニルフェノールのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸は、各試験区におけるゲニステインの濃度を示し、左端の0のカラムは、p-ノニルフェノールのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区（p-ノニルフェノール無



添加区)を示す。縦軸は、ルシフェラーゼ活性値を、p-ノニルフェノール無添加区のルシフェラーゼ活性値を100として示す。

【図6】本発明レセプターのリガンド結合領域をコードするDNAを用いたツーハイブリッドシステムにより、E2のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸は、各試験区におけるE2の濃度を示し、左端の0のカラムは、E2のDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区(E2無添加区)を示す。縦軸は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値を、E2無添加区の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値を1として示す。

【図7】本発明レセプターのリガンド結合領域をコードするDNAを用いたツーハイブリッドシステムにより、ビスフェノールAのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸は、各試験区におけるビスフェノールAの濃度を示し、左端の0のカラムは、ビスフェノールAのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区(ビスフェノールA無添加区)を示す。縦軸は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値を、ビスフェノールA無添加区の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値を1として示す。

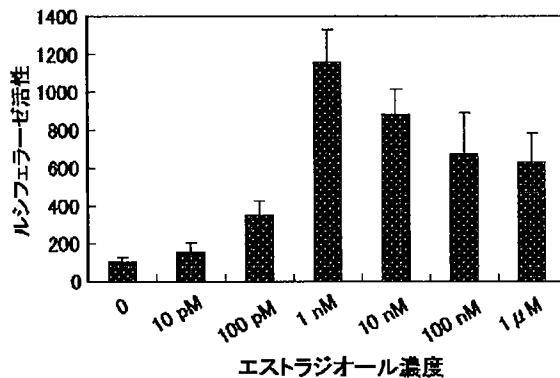
【図8】本発明レセプターのリガンド結合領域をコードするDNAを用いたツーハイブリッドシステムにより、ジェチルスチルベステロール(DES)のエストロゲン

レセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸は、各試験区におけるDESの濃度を示し、左端の0のカラムは、DESのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区(DES無添加区)を示す。縦軸は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値を、DES無添加区の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値を1として示す。

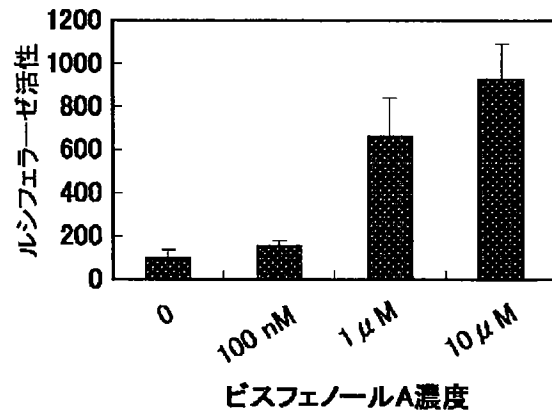
【図9】本発明レセプターのリガンド結合領域をコードするDNAを用いたツーハイブリッドシステムにより、ゲニステインのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸は、各試験区におけるゲニステインの濃度を示し、左端の0のカラムは、ゲニステインのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区(ゲニステイン無添加区)を示す。縦軸は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値を、ゲニステイン無添加区の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値を1として示す。

【図10】本発明レセプターのリガンド結合領域をコードするDNAを用いたツーハイブリッドシステムにより、p-ノニルフェノールのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。横軸は、各試験区におけるゲニステインの濃度を示し、左端の0のカラムは、p-ノニルフェノールのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区(p-ノニルフェノール無添加区)を示す。縦軸は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値を、p-ノニルフェノール無添加区の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性値を1として示す。

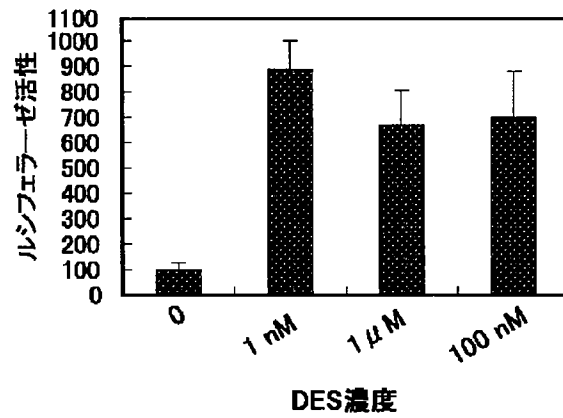
【図1】



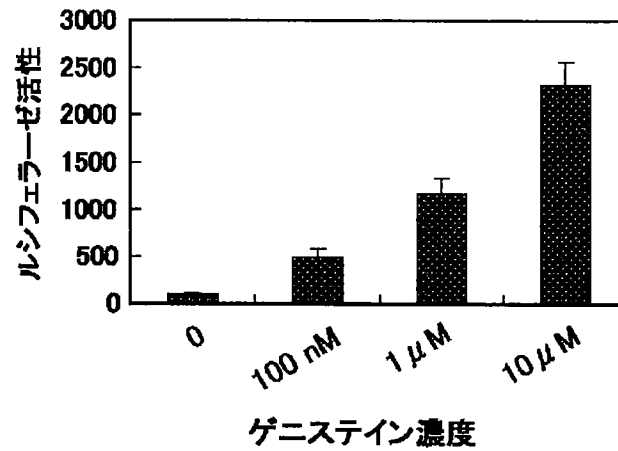
【図2】



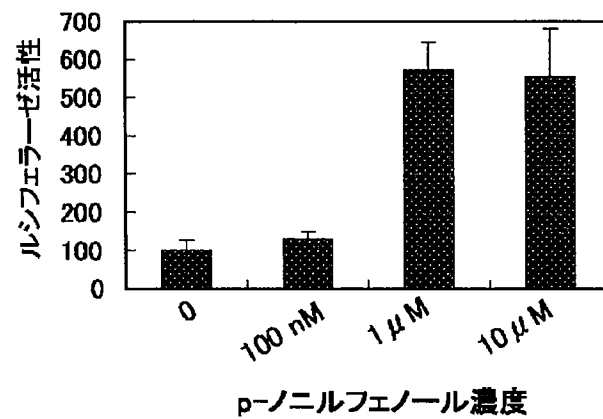
【図 3】



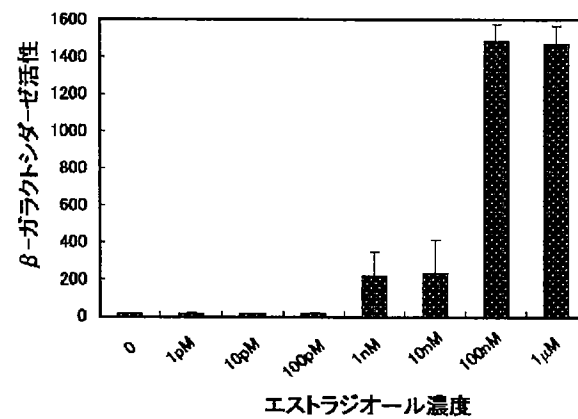
【図 4】



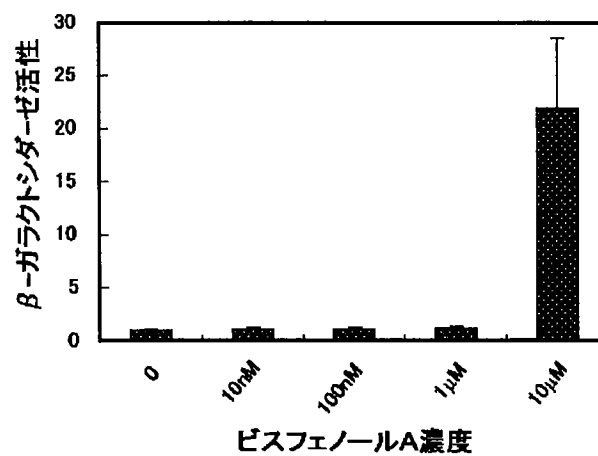
【図 5】



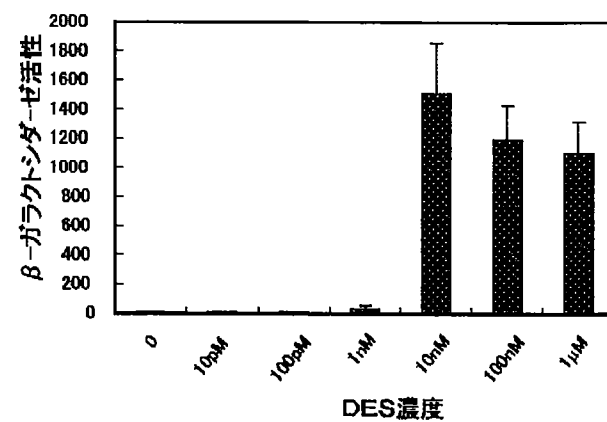
【図 6】



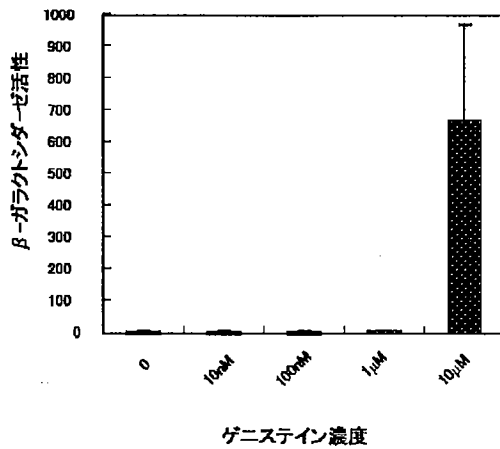
【図 7】



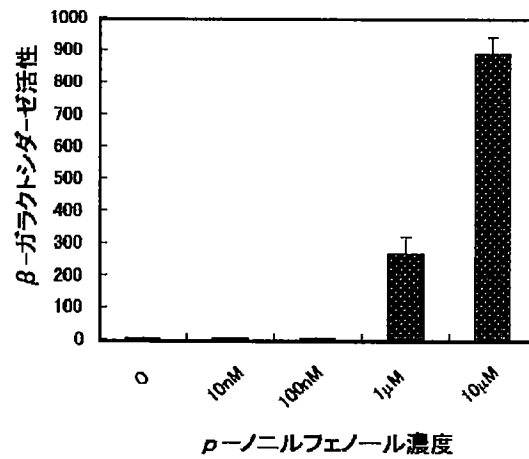
【図 8】



【図 9】



【図 10】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト' (参考)		
C 1 2 P	21/02	C 1 2 Q	1/68	A	4 H 0 4 5
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/15	Z	
	1/68		33/50	Z	
G 0 1 N	33/15		33/566		
	33/50		33/68		
	33/566	C 1 2 N	15/00	Z N A A	
	33/68		5/00	B	

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 CB01 CB21  
 DA12 DA13 DA14 DA26 FB01  
 FB02 FB08 GC15  
 4B024 AA01 AA11 BA63 CA01 DA02  
 DA12 EA02  
 4B063 QA01 QQ02 QQ41 QQ75 QR40  
 QR72 QR76 QS32 QS34 QX01  
 4B064 AG20 CA06 CA10 CA19 CC24  
 DA01 DA13  
 4B065 AA72X AA90X AA95X AB01  
 AC14 BA02 CA44 CA46  
 4H045 AA20 CA40 DA50 EA20 EA50  
 FA74